



**UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
METROPOLITANA**  
Unidad Iztapalapa

**DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

---

**“Establecimiento de cultivos celulares de *Conyza filaginoides* para  
la producción de metabolitos secundarios bioactivos”**

**TESIS**

**Para obtener el título de Maestra en Biotecnología**

**PRESENTA**

**Miriam Coral Soto Hernández**

**Dr. Francisco Cruz Sosa  
Dra. Angélica Román Guerrero  
Dr. Antonio Bernabé Antonio**

**Director  
Asesor  
Asesor**

**Ciudad de México, noviembre 2020**

***Esta tesis fue desarrollada en:***

Laboratorio R-003 de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa(UAM-I), bajo la dirección del Doctor Francisco Cruz Sosa



**UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
METROPOLITANA**  
Unidad Iztapalapa



Laboratorio 307 del centro de investigaciones químicas(CIQ) y laboratorio de espectrometría de masas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos(UAEM)



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

La presente investigación fue financiada por el CONACYT con numero de beca 939381.



El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

**“Establecimiento de cultivos celulares de *Conyza filaginoides* para la producción de metabolitos secundarios bioactivos”**

Que presentó la estudiante

Miriam Coral Soto Hernández

### **Comité Tutorial**

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa

Asesora: Dra. Angélica Román Guerrero

Asesor: Dr. Antonio Bernabé Antonio

### **Jurado**

Presidenta:



\_\_\_\_\_  
Dra. Angélica Román Guerrero

Vocal:



\_\_\_\_\_  
Dr. Antonio Bernabé Antonio

Secretario:



\_\_\_\_\_  
Dr. Gabriel Alfonso Gutiérrez Rebolledo

Vocal:



\_\_\_\_\_  
Dra. Mariana Sánchez Ramos

Ciudad de México, a 18 de noviembre del 2020

*La vida es una melodía con notas altas y bajas, solo hay que saberla escuchar,  
amar, sentir y entender entonces te encontraras con tu alma para poder  
componerla, gozarla, bailarla y cantarla a una frecuencia alta*

*Coral Soto*

*Una persona nace cuando se conoce a sí misma. Es la identidad la que le dará  
sueños y metas de las cuales realmente pueda disfrutar*

*Enrique Cardoso*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Francisco Cruz Sosa por brindarme siempre su apoyo y orientación en el cumplimiento de mis objetivos y por permitirme formar parte de su grupo de investigación.

A la Dra. Mariana Sánchez Ramos por su gran apoyo, impulso, consejos, orientación, asesoramiento, pero sobretodo por ser un ser de luz y sabiduría que comparte conocimiento tanto de investigación como personal.

A la Dra. Angélica Román Guerrero por sus observaciones y conocimiento compartido que fueron claves para el desarrollo del presente proyecto de investigación.

Al Dr. Antonio Bernabé Antonio por la asesoría y por la revisión del manuscrito de la tesis

Al Dr. Gabriel Alfonso Gutiérrez Rebolledo por sus observaciones y conocimientos compartidos durante la revisión y evaluación del presente proyecto.

A mi querida amiga Alejandra que me ha acompañado durante mi crecimiento en varias etapas de mi vida, por su gran apoyo y conocimiento infinito, por compartir muchos momentos de felicidad durante nuestra estancia de licenciatura y posgrado en el laboratorio y universidad, pero sobre todo gracias por ser una gran amiga y ser humano.

A Miriam y Enrique, por su luz, sabiduría, amor y gran entendimiento que me guiaron para encontrarme con mi propio ser de luz y amor.

A mí misma por ayudarme a encontrar con gran perseverancia, paciencia y cobijo, a mi propio ser a través del amor, libertad, paz y felicidad que son preciados tesoros en mi camino de vida y profesional.

A mis compañeros de laboratorio Alejandra, Karla, Kate, Elvia, Abraham, Brenda, Alejandro y Roberto que me ofrecieron su apoyo y fueron la razón de muchos momentos de felicidad y risas durante mi estancia en el laboratorio.

A mi familia por su apoyo, cobijo y amor durante todo momento.

A mis hermanos Karen y Rafita por sus consejos, amor y recomendaciones para la toma de decisiones importantes en mi vida que contribuyeron a la elección de mi camino como investigadora.

## ÍNDICE

<b>1.INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
<b>2.1 Conyza filaginoides (D.C.) Hieron</b> .....	3
2.1.1 Generalidades de <i>Conyza filaginoides</i> (D.C.) Hieron.....	3
2.1.2. Distribución geográfica .....	4
2.1.3 Uso de <i>C. filaginoides</i> en la medicina tradicional.....	5
2.1.4 Compuestos bioactivos producidos por <i>C. filaginoides</i> .....	7
<b>2.2 Metabolitos secundarios y su importancia</b> .....	13
2.2.1 Metabolismo primario y secundario.....	13
2.2.2 Aplicación comercial de los metabolitos secundarios.....	15
2.2.3 Terpenoides .....	16
2.2.3.1 Funcion de los terpenos en plantas .....	19
2.2.3.2 Importancia comercial de los terpenos .....	20
2.2.3.3 Triterpenos pentacíclicos .....	21
2.2.3.3.1 Lupeol .....	22
2.2.3.3.2 $\alpha$ -amirina y $\beta$ -amirina .....	23
2.2.4 Polifenoles.....	24
2.2.4.1 Funciones de los polifenoles en plantas.....	26
2.2.4.2 Bioactividades de los polifenoles .....	27
2.2.4.3 Rutina, Isoquercetina y quercetina .....	28
2.2.4.3.1 Bioactividades de Rutina, Isoquercetina y quercetina .....	28
<b>2.3 Cultivo <i>in vitro</i> para producción de metabolitos secundarios</b> .....	29
2.3.1 Principio del cultivo de células vegetales .....	31
2.3.2 Tipos de cultivo <i>in vitro</i> de células vegetales .....	32
2.3.2.1 Cultivos de callos .....	32
2.3.2.2 Cultivos de células en suspensión .....	34
2.3.3 Condiciones de un cultivo <i>in vitro</i> .....	35
2.3.3.1 Esterilidad .....	35
2.3.3.2 Temperatura .....	35

2.3.3.3 Humedad relativa.....	36
2.3.3.4 Ciclo de luz.....	36
2.3.3.5 Nivel de acidez (pH).....	36
2.3.3.6 Medios de cultivo .....	36
2.3.3.6.1 Composición de los medios de cultivo .....	39
2.3.3.6.1.1 Sales minerales .....	39
2.3.3.6.1.2 Reguladores de crecimiento .....	40
2.3.3.6.1.3 Agentes quelatos .....	45
2.3.3.6.1.4 Carbohidratos.....	45
2.3.3.6.1.5 Vitaminas .....	45
2.3.3.6.1.6 Aminoácidos.....	45
2.3.3.6.1.7 Agente gelificante .....	46
2.3.3.6.1.8 Agua .....	46
3. JUSTIFICACIÓN .....	47
4.HIPÓTESIS .....	48
5.OBJETIVOS.....	48
5.1 Objetivo general .....	48
5.1.1Objetivos específicos .....	48
6. METODOLOGÍA .....	49
6.1 Establecimiento del cultivo aséptico de plántulas de <i>C. filaginoides</i> ... 50	
6.1.1 Material vegetal .....	50
6.1.2 Desinfección de semillas de la especie <i>C. filaginoides</i> .....	50
6.1.3 Cultivo <i>in vitro</i> de semillas de <i>C. filaginoides</i> en medio aséptico... 52	
6.1.4 Determinación del % de desinfección de semillas y % de germinación .....	52
6.2 Establecimiento de cultivo de callos.....	52
6.3 Extracción e identificación de compuestos fitoquímicos en biomasa de cultivo de callo de <i>C. filaginoides</i> .....	53
6.3.1. Obtención de extractos de biomasa de cultivos de células de callo de <i>C. filaginoides</i> .....	53
6.3.2. Obtención de extractos de las partes aéreas de <i>C. filaginoides</i> ....	54

6.3.3. Identificación cualitativa de presencia de compuestos en los diferentes tratamientos de callo de explante de hoja y pecíolo de <i>C. filaginoides</i> por cromatografía en capa fina.....	54
6.3.4 Identificación de compuestos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	54
6.4 Análisis estadístico.....	55
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>56</b>
7.1 Establecimiento de un método de micropropagación de <i>C. filaginoides</i> .....	56
7.1.1 Desinfección de semillas de la especie <i>C. filaginoides</i> .....	57
7.1.2 Germinación de semillas de la especie <i>C. filaginoides</i> .....	59
7.2 Inducción a callo de <i>C. filaginoides</i> .....	63
7.2.1 Respuestas de inducción a callogénesis en explante de hoja .....	64
7.2.2. Respuestas de inducción a callogénesis en explante de pecíolo ..	64
7.2.3 Comparación de callos obtenidos de explantes de hoja y pecíolo .	65
7.2.3.1 Formación de raíces.....	72
7.3. Perfil fotoquímico de los diferentes tratamientos de callo de explante de hoja y pecíolo de <i>C. filaginoides</i> .....	74
7.3.1 Rendimiento de extractos de cultivo de callo y planta silvestre .....	76
7.4 Identificación de compuestos en tratamientos de cultivo de callo por CG-MS .....	78
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>84</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>85</b>
<b>10.REFERENCIAS.....</b>	<b>86</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Generalidades y clasificación taxonómica de <i>C. filaginoides</i> .....</b>	<b>3</b>
<b>Tabla 2. Estudios fitoquímicos y farmacológicos de <i>C. filaginoides</i>.....</b>	<b>8</b>
<b>Tabla 3 . Clasificación y estructura de compuestos aislados con actividad farmacológica de <i>C. filaginoides</i> .....</b>	<b>10</b>
<b>Tabla 4. Metabolitos secundarios de origen vegetal con potencial a nivel comercial, producidos mediante cultivos o plantaciones tradicionales (Martínez, 2018). .....</b>	<b>16</b>
<b>Tabla 5. Función de algunos terpenoides en la planta .....</b>	<b>19</b>
<b>Tabla 6. Terpenos de aplicación comercial (Álvarez, 2014).....</b>	<b>20</b>
<b>Tabla 7. Actividades farmacológicas del lupeol .....</b>	<b>22</b>
<b>Tabla 8. Actividades farmacológicas de <math>\alpha</math>-amirina y <math>\beta</math>-amirina .....</b>	<b>23</b>
<b>Tabla 9. Actividades farmacológicas de los polifenoles .....</b>	<b>27</b>
<b>Tabla 10. Metabolitos secundarios producidos mediante cultivos de callo de diversas especies de plantas .....</b>	<b>33</b>
<b>Tabla 11. Composición del medio Murashige y Skoog (Vargas y Flota, 2006) .....</b>	<b>37</b>
<b>Tabla 12. Composición del medio Nitsch y Nitsch (Vargas y Flota, 2006) .....</b>	<b>38</b>
<b>Tabla 13. Composición del medio White (Vargas y Flota, 2006) .....</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 14. Reguladores de crecimiento de uso común y sus abreviaturas (Baltz et al., 2010). .....</b>	<b>41</b>
<b>Tabla 15. Tratamientos de desinfección empleados para semillas de <i>C. filaginoides</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>Tabla 16. Combinaciones de RCV's (tratamientos) para la inducción a callogénesis en la especie <i>C. filaginoides</i> .....</b>	<b>53</b>
<b>Tabla 17. Rendimiento de extracto de la planta silvestre .....</b>	<b>76</b>
<b>Tabla 18. Rendimiento de extractos de biomasa de cultivo de callo de <i>C. filaginoides</i> .....</b>	<b>77</b>
<b>Tabla 19. Especies de plantas productoras de <math>\alpha</math>-amirina, <math>\beta</math>-amirina y lupeol por medio de cultivo de callo .....</b>	<b>80</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Distribución geográfica de <i>C. filaginoides</i> en México.....</b>	<b>4</b>
<b>Figura 2. Descripción de <i>C. filaginoides</i> del libro Historia Natural de la Nueva España escrito por Francisco Hernández en el siglo XVI.....</b>	<b>5</b>
<b>Figura 3. Esquema del metabolismo secundario y primario en plantas (Álvarez, 2014).....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 4. Rutas de biosíntesis para la producción de difosfato de isopentenilo (IPP) y difosfato de dimetialilo (DMAPP). La vía del mevalonato (izquierda) y la vía del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (derecha) (tomado y editado de Orhan, 2012).....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 5. Biosíntesis de triterpenos pentacíclicos a partir de 2,3-oxidoscualeno .....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 6. Estructura química de compuestos polifenólicos no flavonoides (Vázquez, 2014).....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 7. Estructura química de compuestos polifenólicos de tipo flavonoides (Vázquez, 2014).....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 8. Estructuras de las auxinas AIA, 2,4-D, ANA y picloram.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 9. Estructuras de las citoquininas KIN y BAP .....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 10. Esquema general del desarrollo experimental de la presente investigación. ....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 11. Semillas seleccionadas de <i>C. filaginoides</i> .....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 12. % de desinfección de semillas de <i>C. filaginoides</i> obtenido de diferentes tratamientos aplicados. Letras distintas indican diferencias significativas a un nivel de confianza de 95%. ....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 13. Germinación de semillas de <i>C. filaginoides</i> en el día 15 de cultivo obtenidas mediante el tratamiento C.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 14. Plántula de 2 meses de edad <i>C. filaginoides</i> .....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 15. % de germinación de semillas de <i>C. filaginoides</i>, obtenido de diferentes tratamientos aplicados. ....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 16. % de callo obtenido en los diferentes tratamientos aplicados a explantes de hoja de <i>C. filaginoides</i>, n= 4 .....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 17. % de callo obtenido en los diferentes tratamientos aplicados a explantes de pecíolo de <i>C. filaginoides</i>, n= 3 .....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 18. Respuesta morfogénica de callo del tratamiento 3 de explante de hoja.....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 19. Oxidación de células de cultivo de callo del tratamiento 10 (explante de hoja .....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 20. Respuesta morfogénica de callo, a) explante de hoja tratamiento 6, b) explante de pecíolo tratamiento 6, c) explante de hoja tratamiento 14 y d) explante de pecíolo tratamiento 14. ....</b>	<b>70</b>

<b>Figura 21. Respuesta morfogenética de raíz del tratamiento 8 de explante de hoja.....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 22. Extractos obtenidos de biomasa de cultivo de callo de los tratamientos 2, 3, 6 y 14, respectivamente.....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 23. Cromatoplasmas de los extractos de cultivo de callo y planta silvestre de <i>C. filaginoides</i> .....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 24. Espectro de masas de <math>\beta</math>-amirina en extractos de diclorometano-metanol (1:1) tratamiento 3 obtenidas por CG-MS.....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 25. Espectro de masas de <math>\alpha</math>-amirina en extractos de diclorometano-metanol (1:1) tratamiento 3 obtenidas por CG-MS.....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 26. Espectro de masas de lupeol en extractos de diclorometano-metanol (1:1) tratamiento 3 obtenidas por CG-MS.....</b>	<b>79</b>

## ABREVIATURAS

**RCV:** Reguladores de crecimiento vegetal.

**CTV:** Cultivo de tejidos vegetales.

**MS:** Murashige & Skoog.

**ANA:** Ácido naftalenacético.

**AIA:** Ácido indolacético.

**BAP:** 6-benzilaminopurina.

**KIN:** 6-furfurilaminopurina.

**2,4-D:** Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

**PIC:** Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico.

**NaClO:** Hipoclorito de sodio.

**TP:** Triterpenos pentacíclicos.

**AAC:** Acetil-CoA: acetil-CoA C-acetiltransferasa.

**CMK:** 4- (citidina-5'-difosfo) -2-C-metileritritol quinasa.

**DXPS:** 1-desoxilulosa-5-fosfato sintasa.

**DXR:** 1-desoxilulosa-5-fosfato reductoisomerasa.

**FPP:** Difosfato de farnesilo.

**GGPP:** Difosfato de geranilgeranilo.

**GPP:** Difosfato de geranilo.

**HMGR:** 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa.

**HMGS:** 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa.

**IPPI:** Isopentenil difosfato isomerasa.

**MCT:** 2-Cmetileritritol-4-fosfato citidiltransferasa.

**MDC:** Mevalonato-5-difosfato descarboxilasa.

**MECPS:** 2-Cmetileritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa.

**MK:** Mevalonato quinasa.

**PMK:** Fosfomevalonato quinasa.

## RESUMEN

*Conyza filaginoides* es una planta originaria de México, conocida comúnmente como “simonillo”, y en la lengua náhuatl como “zacachichic”. En el México contemporáneo es ampliamente comercializada como un medicamento crudo para preparar infusiones y otras fitomedicinas (extractos, cápsulas o tabletas). Debido a ello, en los últimos años se han realizado numerosos estudios fitoquímicos de la planta silvestre los cuales han permitido identificar compuestos bioactivos con diversas propiedades farmacológicas validando su uso como planta medicinal, sin embargo, el creciente interés por esta especie ha derivado en su sobreexplotación limitando significativamente su propagación y distribución a nivel geográfico, ocasionando a que actualmente *C. filaginoides* sea una especie en riesgo de peligro de extinción, por tal motivo es importante la búsqueda de nuevas alternativas que permitan satisfacer la demanda comercial de la misma, con el objetivo de cuidar al mismo tiempo su preservación. La técnica de cultivo *in vitro* es una alternativa viable para obtener una amplia disponibilidad de la planta, ya que permite bajo condiciones controladas obtener compuestos bioactivos (metabolitos secundarios) de interés como ocurre en la planta silvestre e incluso cabe la posibilidad de incrementar los rendimientos de tales compuestos.

El presente trabajo tuvo como objetivo establecer cultivos de callos de *C. filaginoides* con la finalidad de ofrecer nuevas alternativas biotecnológicas que permitan obtener rendimientos controlados de compuestos bioactivos de interés industrial presentes en la especie. La primera parte del desarrollo consistió en establecer las condiciones de germinación para la obtención de plántulas bajo condiciones asépticas, a partir de semillas de la especie aplicando 3 métodos de desinfección, posteriormente se indujeron a callogénesis explantes de hoja y pecíolo de plántulas de 2 meses de edad mediante un diseño experimental de 16 tratamientos que consistió en colocar los tejidos vegetales (explantes) en medio de cultivo MS (Murashige & Skoog) suplementado con diferentes combinaciones de 2 grupos diferentes de reguladores de crecimiento vegetal (RCV): auxinas y citoquininas manteniendo los cultivos bajo condiciones de incubación de  $25 \pm 2$  °C con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8h oscuridad. Los parámetros evaluados fueron

porcentaje (%) de callogénesis y friabilidad a los 24 de días de cultivo. Los tratamientos 6 (0.1 mg/L KIN + 1 mg/L PIC) y 14 (0.1 mg/L BAP + 1 mg/L PIC) mostraron sobresaliente respuesta de % callogénesis con características morfológicas deseables (apariencia friable sin oxidación y mayor crecimiento celular) en ambos explantes (hoja y pecíolo). Finalmente, mediante la técnica de cromatografía en capa fina con un sistema de elusión de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (95:05), se encontró que los extractos de diclorometano-metanol (1:1) obtenidos de biomasa de cultivo de callo de hoja de los tratamientos 2, 3, 6 y 14 presentaron el perfil fitoquímico más amplio y similar al de planta silvestre. Estos extractos se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS), identificando tres triterpenos pentacíclicos (lupeol,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina) en el tratamiento 3 (0.1 mg/L KIN + 0.1 mg/L 2,4-D). De lo anterior, se puede decir que el cultivo *in vitro* de *C. filaginoides* produce compuestos de la misma naturaleza que la planta silvestre. Cabe resaltar que estos compuestos son de gran interés farmacológico por su actividad hepatoprotectora, antihiper glucémica e hipolipidémica, entre otras, por lo cual en las últimas décadas se ha enfocado la atención en la producción de los mismos mediante diferentes estrategias tecnológicas incluyendo la biotecnología vegetal.

La principal contribución del presente trabajo fue el establecimiento de una nueva alternativa para la producción de compuestos bioactivos de interés farmacológico a partir de la especie *C. filaginoides*, cabe resaltar que es la primera vez que se registra la obtención de los tres triterpenos lupeol,  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina usando una misma combinación de RCV mediante la técnica de cultivo *in vitro* de plantas, por lo cual, tal hallazgo puede ser una gran aportación para la optimización en la producción comercial de tales compuestos o bien proporcionar información a futuras investigaciones y disciplinas como la ingeniería metabólica y genética encaminadas a la obtención y mejoramiento en la producción de estos compuestos y sus derivados por medio de una misma línea celular *in vitro*.

## ABSTRACT

*Conyza filaginoides* is a plant native to Mexico, commonly known as “simonillo”, and in the Aztec language as “zacachichic”. In contemporary Mexico it is widely marketed as a crude medicine to prepare infusions and other phytomedicines (extracts, capsules or tablets), for this reason in recent years there have been numerous phytochemical studies of the wild species, which have made it possible to identify the presence of bioactive compounds with various pharmacological properties, validating its use as a medicinal plant; however, the growing interest in this species has derived in its overexploitation, significantly limiting its spread and distribution at a geographical level, leading it to be considered a species at risk of extinction. For this reason, it is important to search for new alternatives which allow satisfying the commercial demand of this medicinal specie, with the aim of take care of its ecological preservation at the same time. In this context, *in vitro* culture is an excellent option to obtain a greater bio-availability and final yield of the plant biomass, in addition to the fact that under controlled growing conditions applied, by means of biotechnological techniques, it is possible also to obtain a greater amount of bioactive compounds (secondary metabolites) of pharmacological and industrial interest.

The present work aimed to establish the conditions of *in vitro* callus culture of *C. filaginoides* with the objective of offering new biotechnological alternatives that allow obtaining greater final yields of plant's biomass as well its bioactive compounds of industrial and pharmacological interest present in this species. Experimental development of this project consisted firstly in establishing germination conditions of seedlings from seeds of this species, applying 3 different disinfection methods; later, seedlings of 2 months of age, obtained from leaf and petiole explants were induced to callogenesis through an experimental design of 16 diverse treatments, that consisted in placing the plant tissues in MS culture medium (Murashige & Skoog) supplemented with different combinations of 2 different groups of plant growth regulators (PGR's): auxins and cytokinins, keeping cultures under incubation conditions of  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , with a photoperiod of 16 h light / 8 h dark, where the evaluated parameters were porcentaje (%) of callogenesis and friability on day 24 of culture.

Treatments 6 (KIN 0.1 mg/L + PIC 1 mg/L) and 14 (BAP 0.1 mg/L + PIC 1 mg/L) showed an outstanding response of % callogenesis, with desirable morphological characteristics (friable appearance without oxidation and high cell growth) in both explants (leaf and petiole). Finally, from dichloromethane-methanol extracts (1: 1), obtained from dried and finely grounded biomass of each combination (16 treatments), it was observed that treatments 2, 3, 6 and 14 of the leaf explant, contained the most complex phytochemical profile, similar to that showed by wild plants, this was achieved by means of thin layer chromatography with an elution system of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (95:05). Extracts of these last treatments were analyzed through gas chromatography technique coupled to mass (GC-MS), identifying the presence of three pentacyclic triterpenes (lupeol,  $\alpha$ -amirin,  $\beta$ -amirin) in treatment 3 (KIN 0.1 mg/L and 2,4-D 0.1 mg/L) extract, allowing to conclude that the cultures *in vitro* of this species produced compounds of the same nature, as those identified in the wild plant. It is important to mention that such compounds are of great pharmacological interest due to their hepatoprotective, antihyperglycemic and hypolipidemic activity, among others, which is why in recent decades attention has been focused on their production through different techniques strategies including plant biotechnology.

The main contribution of this work was the establishment of a new alternative for the production of bioactive compounds of pharmacological interest from *C. filaginoides*, it should be noted that it is the first time that the obtaining of three triterpenes, lupeol,  $\alpha$ -amyrin, and  $\beta$ -amyrin through the same combination of PGR's mixed for *in vitro* plant culture technique, for this reason such a finding can be a great contribution in the optimization for the commercial production of such compounds or provide information for future research and disciplines, such as metabolic and genetic engineering aimed to obtain and improve the production of these compounds and their derivatives in the same *in vitro* cell line.



## 1.INTRODUCCIÓN

Las plantas son fuente de un gran número de productos metabólicos de importancia comercial y son usados en las industrias farmacéutica, alimenticia, de cosméticos y como fuentes de numerosas sustancias de interés agroquímico (Karuppusamy, 2009). La mayoría de los compuestos biológicamente activos aislados de las plantas son metabolitos secundarios (Walton & Brown, 1999) los cuales presentan una gran variabilidad (se estima que más de 100 000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas (Bhalla *et al.*, 2005)) y por ende representan una fuente renovable potencialmente ilimitada para el desarrollo de nuevos fármacos. De acuerdo a datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se han utilizado como fuente para la producción de fármacos aproximadamente entre 35 000 y 70 000 especies de plantas. Este número corresponde al 14-28% de las 250,000 especies de plantas que se estima existen en todo el mundo (Malik, 2017). En la actualidad, algunos de estos principios activos pueden obtenerse mediante síntesis química, sin embargo, el uso de fármacos obtenidos por esta vía química deriva en efectos secundarios en los pacientes (Walton & Brown, 1999; Malik, 2017), por otra parte al ser extraídos de plantas silvestres o cultivadas tiene una serie de desventajas ya que su acumulación en las plantas es baja y lenta, ya que está regulada espacial y temporalmente, es decir, ocurre en células, órganos y tejidos específicos, en fases determinadas del ciclo de vida de la planta, bajo condiciones estacionales o de estrés (Silvestrine *et al.*, 2002; Pérez & Jiménez, 2011). Puede existir alta variabilidad entre poblaciones e inclusive entre individuos. En el caso de plantas silvestres, su explotación comercial está basada en la recolección de material en su hábitat natural, frecuentemente incluyendo la raíz, lo que ha provocado que muchas estén amenazadas o en peligro de extinción.

Una alternativa al cultivo tradicional de plantas y extracción química de metabolitos, así como a los efectos secundarios derivados de fármacos obtenidos mediante síntesis química es la técnica de cultivo *in vitro* de células vegetales dentro de la cual se encuentran el cultivo de callo, suspensiones celulares, embriones somáticos

u órganos que se llevan a cabo en medios artificiales y en condiciones asépticas siendo posible controlar las condiciones del medio y poder alcanzar un mayor rendimiento y calidad del producto final, así como preservar la biodiversidad cuando las plantas objeto de interés estén en peligro de extinción (Pérez & Jiménez, 2011; Martínez *et al.*, 2018; Chavdarova, 2019).

*Conyza filaginoides* (D.C.) Hieron (Asteraceae) es una hierba anual corta de color verde grisáceo con un sabor amargo, comúnmente conocido en México como "simonillo". Crece en hábitats abiertos y perturbados de bosques templados de pinos y robles y praderas desde el norte de México (Estado de Chihuahua) hasta el sur de Guatemala. Conocido en la lengua náhuatl como "zacachichic" (hierba amarga), ha sido apreciada desde tiempos prehispánicos para tratar dolencias gastrointestinales como flatulencia, cólico y malestar estomacal, y para estimular el apetito. Los usos menores incluyen su empleo como emético, para lavar los ojos infectados, aliviar la tos y expulsar la flema (Hernández, 1959; Mata *et al.*, 1997). En la actualidad es ampliamente comercializada en México como un medicamento crudo para preparar infusiones y otras fitomedicinas (extractos, cápsulas o tabletas), que se recetan para el alivio de trastornos digestivos dolorosos, como dispepsia, enfermedades hepáticas y cólico biliar (Ovalle *et al.*, 2014). Estudios científicos respaldan el uso de la especie demostrando que la misma posee diversos compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas, relajantes del músculo liso, antiprotozoarias, hipoglucemiante y antihiperoglucemiante, por tal motivo el objetivo del presente trabajo está centrado en el establecimiento de cultivos de cultivo de callo de *C. filaginoides* con la finalidad de ofrecer nuevas alternativas biotecnológicas que permitan obtener rendimientos controlados de compuestos bioactivos de interés industrial, como son los fármacos de origen natural, cuidando al mismo tiempo la preservación natural de la especie.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Conyza filaginoides (D.C.) Hieron

#### 2.1.1 Generalidades de *Conyza filaginoides* (D.C.) Hieron

Es una planta originaria de México, conocida comúnmente como “simonillo”, “falso sacalechinchí”, “gordolobo”, “hierba de las ánimas”, “rosilla” y en la lengua azteca como “zacachichic” (Mata *et al.*, 1997). Pertenece a la familia Asteraceae y orden Asterales, taxonómicamente también se puede encontrar con el sinónimo *Laennecia filaginoides* DC (Catalogue of life, 2020).

Tabla 1. Generalidades y clasificación taxonómica de *C. filaginoides*



#### CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

**Reino:** *Plantae*

**Filo:** *Tracheophyta*

**Clase:** *Magnoliopsida*

**Orden:** *Asterales*

**Familia:** *Asteraceae*

**Género:** *Conyza filaginoides*  
(D.C.) Hieron

**Sinónimo** = *Laennecia*  
*filaginoides* DC

(Catalogue of life, 2020).

<b>Aspecto</b>	Hierba anual de color verde grisáceo, sabor amargo
<b>Altura</b>	30-60 cm, con abundantes pelos y aspecto lanoso
<b>Flores</b>	Color blanco-verdosas, a veces ligeramente rojizas, agrupadas en espigas alargadas
<b>Hojas</b>	Hojas angostas, de 1 a 3 cm de largo, con uno a cinco dientes en cada lado de la hoja
<b>Floración</b>	Septiembre - Octubre
<b>Cosecha</b>	Noviembre
<b>Clima</b>	semicálido y templado
<b>Condiciones de crecimiento</b>	Crece en matorral xerófilo, pastizal, bosques de encino, de pino y bosque de juníferos. (Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Mata <i>et al.</i> , 1997).

### 2.1.2. Distribución geográfica

Se encuentra distribuida en hábitats abiertos de bosques templados de pino-encino y pastizales, con ejemplares en Estados Unidos de América (Texas), mientras que en México se encuentra distribuida desde Aguascalientes, Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tlaxcala, Veracruz hasta Zacatecas (Figura 1), llegando a encontrarse incluso en Guatemala, Perú, Ecuador, Venezuela (Mérida, Sucre) y Colombia (Boyacá, Cundinamarca, Nariño) (Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana, UNAM 2009 ; Catalogue of life, 2020).



**Figura 1. Distribución geográfica de *C. filaginoides* en México**

Tomado de:

<http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/41d6f9fb865ff8f2933678c089dc7eac/synonym/d274dfbd12c4889bcb65455ab028e8c6>

### 2.1.3 Uso de *C. filaginoides* en la medicina tradicional

La planta *C. filaginoides* ha sido apreciada desde tiempos prehispánicos para tratar dolencias gastrointestinales como flatulencias, cólicos y malestar estomacal, además de estimular el apetito. Los usos menores incluyen su empleo como emético, para lavar los ojos infectados, aliviar la tos y expulsar la flema (Hernández, 1959; Mata *et al.*, 1997).



Esta planta se ha usado medicinalmente por más de cuatro siglos; así, la primera descripción de su uso medicinal apareció en el libro "Historia Natural de la Nueva España" escrito por Francisco Hernández en el siglo XVI (Figura 2).



*"ZACACHICHIC" una hierba de palmo y medio, toda vellosa, blanquecina y con hojas menudas casi como de ruda, llena por todas partes de florecillas rojizas con blanco, peludas, que se deshacen en vilanos y contenidas en pequeños cálices redondeados. y con raíz fibrosa. Es muy amargo de dónde le viene el nombre, y caliente y seco en tercer grado. Huele a ojo de buey. El jugo que puede exprimirse de una onza y media de esta hierba purga por el conducto superior todos los humores, pero principalmente la bilis y las flemas. Dicen que es un remedio seguro y que no causa casi ninguna molestia; pero no debe administrarse imprudentemente a los que tienen Fiebre, sino sólo a los que, sin fiebre, tienen el estómago lleno de humores viciados; cura el empacho, excita el apetito, favorece mucho a aquellos a quienes los alimentos se les acedan en el estómago, cura el prurito de los ojos y es eficaz para calmar la tos, quitar la flatulencia y apaciguar, introducido, el vientre. Nace en regiones templadas de Tepetlauztoc y de Tetzoco en lugares planos y en las laderas.*

**Figura 2. Descripción de *C. filaginoides* del libro Historia Natural de la Nueva España escrito por Francisco Hernández en el siglo XVI.**

A la izquierda dibujo descriptivo y a la derecha descripción general y uso de la planta en la medicina prehispánica. Planta conocida en la lengua azteca como "zacachichic".

**A inicios del siglo XX**, el Instituto Médico Nacional la describe como: colagogo, emético y favorecedor del peristaltismo intestinal. Posteriormente, Maximino Martínez consigna su uso para: la angiocolitis, aperitivo, carminativo, cólicos hepáticos, dispepsia, emético, eupéptico, gastroenteritis, ictericia, depresión, analgésico y favorece el peristaltismo intestinal. Luis Cabrera, la describe para: la angiocolitis, catártico, colecistitis, gastroenteritis e ictericia. Finalmente, la **Sociedad Farmacéutica de México** la indica como: anticatarral, colagogo, cólicos biliosos,



eupéptico, para gastroenteritis, heridas, náusea, y nefrotóxico (Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).



Conocida popularmente como "simonillo", es una planta medicinal mexicana muy apreciada en el **México contemporáneo** para el tratamiento del malestar estomacal y molestias dolorosas. La planta completa se puede consumir en forma de té, sola o en combinación con otras hierbas (Fonseca *et al.*, 2020) como *Marrubium vulgare* L.

(Lamiaceae), *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae) y *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). En el centro de México, también es un aperitivo común (Ovalle *et al.*, 2014).

En la actualidad, la planta entera es ampliamente comercializada en México como un medicamento crudo para preparar infusiones y otras fitomedicinas (extractos, capsulas y tabletas), los extractos de la planta son preparados hidroalcohólicos a partir de una relación droga/extracto de 1:10, también son conocidos como tinturas, y se consumen antes de las comidas diluyendo unas 30 gotas del extracto en agua (1 o 3 veces al día) (Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2018; Acevedo & Estrada, 1995; <https://www.plantas-medicinales.org/conyza-filaginoides-simonilla/>). Todos estos remedios se recetan para



el alivio de trastornos digestivos dolorosos, como dispepsia, enfermedades hepáticas y cólico biliar (Ovalle *et al.*, 2014), mismos autores desarrollaron métodos analíticos precisos para garantizar el control de calidad para el uso adecuado de la planta y sus resultados fueron publicados en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos 2° edición (FEUM, 2013).

Debido al creciente interés en las propiedades terapéuticas que ofrece la especie se han realizado numerosos estudios fitoquímicos a la misma, los cuales han permitido identificar la presencia de compuestos bioactivos con diversas propiedades farmacológicas validando su uso como planta medicinal.

#### **2.1.4 Compuestos bioactivos producidos por *C. filaginoides***

La planta *C. filaginoides* es una fuente importante de compuestos biológicamente activos. En los últimos años se han realizado numerosos estudios fitoquímicos y farmacológicos en la especie *C. filaginoides* donde se ha determinado la presencia de compuestos bioactivos con propiedades farmacológicas (Tabla 2) los cuales son de naturaleza flavonoide y terpenoide (Tabla 3).

Tabla 2. Estudios fitoquímicos y farmacológicos de *C. filaginoides*

Descripción del estudio	Compuestos con actividad	Métodos de extracción y aislamiento de los compuestos bioactivos	Referencia
Actividad antinociceptiva e hipoglucémica	Rutina	<b>Extracción:</b> material vegetal seco y molido de las partes aéreas de la planta se extrajo con una mezcla de diclorometano-metanol (1: 1), se filtró y el extracto se obtuvo a presión reducida <b>Identificación y cuantificación de rutina:</b> HPLC-DAD, se observó que la rutina era el metabolito principal del extracto obtenido	(Ovalle <i>et al.</i> , 2015)
Actividad antiprotozoaria de los constituyentes	Eritridiol, Quercetina 3-O-(6''-O-E-cafeoil)- $\beta$ -D-glucopiranosido, Quercetina-3-glucósido (Isoquercitina)= activos contra <i>E. histolytica</i> con valores de CI50 que varían de 12.0 a 14.7 $\mu$ g / mL  Isorhamnetin 3-O-(6''-O-E-cafeoyl)- $\beta$ -D-galactopiranosido= compuesto más activo contra <i>G. lamblia</i> con (CI50) 15,3 $\mu$ g / mL	<b>Extracción:</b> material vegetal seco y molido de las partes aéreas de la planta se extrajo con una mezcla de MeOH-CHCl <sub>3</sub> (1: 1), se filtró y concentró al vacío <b>Aislamiento de compuestos:</b> TLC preparativa en gel de Si prerrecubierto (Si gel 60, Merck F254) <b>Identificación de compuestos:</b> resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia infrarroja(IR), punto de fusión(p.f.), espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/VIS)	(Calzada <i>et al.</i> , 2001)
Flavonoides y terpenoides con actividad relajante del músculo liso	Rutina y quercetina-3-glucósido (Isoquercitrina) mostraron una actividad inhibitoria significativamente alta en las contracciones espontáneas del íleon de la rata, donde fueron 7 y 8.76 veces más potentes que la	<b>Extracción:</b> material vegetal seco y molido de las partes aéreas de la planta se extrajo con una mezcla de MeOH-CHCl <sub>3</sub> (1: 1), se filtró y concentró al vacío	(Mata <i>et al.</i> , 1997)

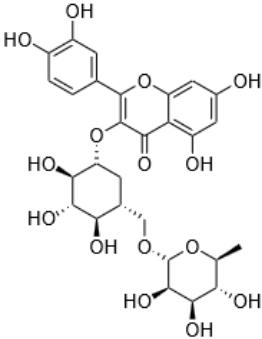
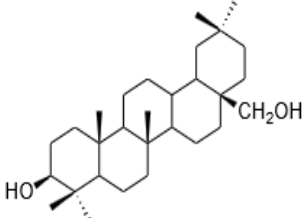
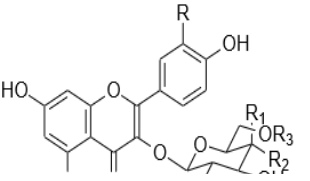


	<p>quercitina (control positivo), respectivamente.</p> <p><b><math>\beta</math>-cariofileno 4,5-<math>\alpha</math>-óxido, 3-<math>\beta</math>-tridecanoiloxi-28-hidroxi-oleano-1 2- eno</b> = actividad inhibitoria moderada en las contracciones espontáneas del íleon de la rata</p>	<p><b>Aislamiento de compuestos:</b> cromatografía en columna de gel de sílice</p> <p><b>Identificación de compuestos:</b> cromatógrafo de gases interconectado con un espectrómetro de masas (GC-MS), espectroscopia infrarroja(IR), punto de fusión( p.f.), resonancia magnética nuclear (RMN),</p>	
<p><b>Efecto de la despigmentación del ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico guiado por la actividad inhibidora de la tirosinasa</b></p>	<p><b>-3,4-di-O-ácido cafeoilquínico, 4-O-ácido cafeoilquínico, el ácido clorogénico y la rutina,</b> mostraron actividad inhibitoria de tirosinasa con CI 50S de 57.7, 393.7, 273.2 Y 113.7 <math>\mu</math>M con inhibición no competitiva</p> <p><b>-3,4-di-O-cafeoilquínico=</b> efecto de despigmentación contra la piel de cobaya marrón irradiada con UVB (el porcentaje de despigmentación fue del 30,8%).</p>	<p><b>Extracción:</b> material vegetal seco y molido de las partes aéreas de la planta se extrajo con agua destilada, se filtró, concentro a presión reducida y liofilizó</p> <p><b>Aislamiento de compuestos:</b> cromatografía en columna de gel de sílice</p> <p><b>Identificación de compuestos:</b> espectroscopia infrarroja(IR), resonancia magnética nuclear (RMN), punto de fusión( p.f.), colorímetro espectrofotométrico, cromatografía en capa fina(TLC)</p>	<p>(Tada <i>et.al.</i>, 2001)</p>
<p><b>Triterpenenoides y triacontano de <i>Conyza filaginoides</i></b></p>	<p><b>Triacontano <math>\alpha</math>-Spinasterol <math>\beta</math>-amirina</b></p>	<p><b>Extracción:</b> material vegetal seco y molido de las partes aéreas de la planta se extrajo por el método Soxhlet con petróleo ligero y MeOH. El extracto de petróleo ligero se saponificó con MeOH-KOH y la porción insaponificable se recogió en éter isopropílico.</p> <p><b>Aislamiento de compuestos:</b> cromatografía en columna de SiO<sub>2</sub></p>	<p>(Domínguez <i>et al.</i>,1972)</p>

**Identificación de compuestos:**

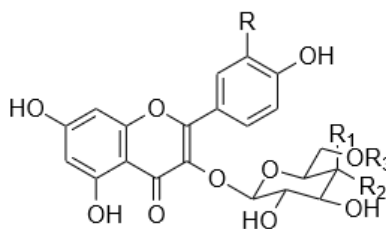
espectroscopia infrarroja(IR), resonancia magnética nuclear (RMN), punto de fusión (p.f.), espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/VIS), cromatografía en capa fina(TLC).

**Tabla 3 . Clasificación y estructura de compuestos aislados con actividad farmacológica de *C. filaginoides***

Estructura	Clasificación	Formula estructural	Referencia
Rutina	Polifenol (flavonoide)		(Ovalle <i>et al.</i> , 2015)
Eritridiol	Terpeno (triterpeno pentacíclico)		(Calzada <i>et al.</i> , 2001)
Quercetina 3-O- (6''-O-E-caffeoil) -β-D-glucopiranosido	Polifenol (flavonoide)	 <p>R=R<sub>2</sub>=OH, R<sub>1</sub>=H, R<sub>3</sub>=TCA</p>	(Calzada <i>et al.</i> , 2001)

**Quercetina-3-glucósido (Isoquercitina)**

Polifenol (flavonoide)

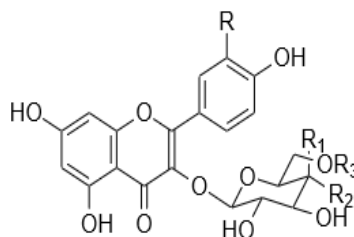


(Calzada *et al.*, 2001)

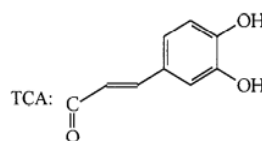
$R=R_2=OH, R_1=R_3=H$

**Isorhamnetin 3-O- (6'' - O-E-cafeoyl) - $\beta$ -D-galactopiranoside**

Polifenol (flavonoide)



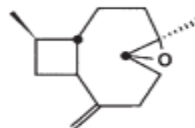
(Calzada *et al.*, 2001)



$R=OMe, R_1=OH, R_2=H, R_3=TCA$

**$\beta$ -cariofileno 4,5- $\alpha$ -óxido**

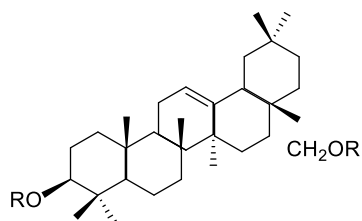
Terpenoide(sesquiterpeno)



(Mata *et al.*, 1997)

**3- $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi-oleano-12-eno**

Terpenoide

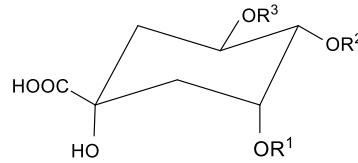


(Mata *et al.*, 1997)

$R=O=C-(CH_2)_{11}-CH_3, R'=H$

**3,4-di-O-ácido  
cafeoilquínico**

Polifenol

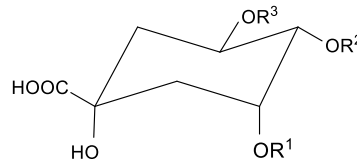


(Tada *et al.*,  
2001)

$R^1=R^2=\text{Cafeoil}$ ,  $R^3=H$

**4-O-ácido  
cafeoilquínico**

Polifenol

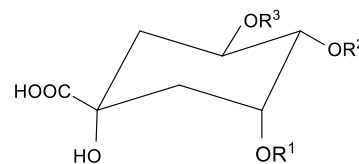


(Tada *et al.*,  
2001)

$R^1=R^3=H$ ,  $R^2=\text{Cafeoil}$

**Ácido  
clorogénico**

Polifenol

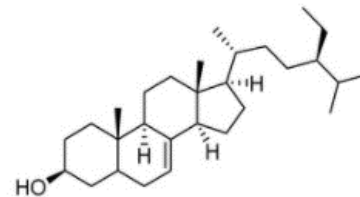


(Tada *et al.*,  
2001)

$R^1=R^2=H$ ,  $R^3=\text{Cafeoil}$

**$\alpha$ -Spinasterol**

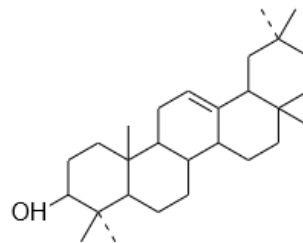
Terpenoide(triterpeno)



(Domínguez *et al.*,1972)

**$\beta$ -amirina**

Terpeno (triterpeno  
pentacíclico)



(Domínguez *et al.*,1972)

## **2.2 Metabolitos secundarios y su importancia**

La mayoría de los compuestos biológicamente activos aislados de plantas son metabolitos secundarios (MS) (Walton & Brown, 1999) los cuales presentan una gran variedad de compuestos (se estima que más de 100 000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas (Bhalla *et al.*, 2005)). Como ya se mencionó anteriormente *C. filaginoides* posee diversos compuestos bioactivos de interés farmacológico los cuales son metabolitos secundarios, que pertenecen al grupo de terpenos y fenoles, en esta sección profundizaremos acerca de la importancia de estos metabolitos secundarios a nivel comercial (incluyendo actividades farmacológicas), además de su función en las plantas.

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que aparentemente no son vitales para las células individuales, sin embargo, a la especie como tal le permite establecer una relación ecológica con el ambiente, estos compuestos son sintetizados como respuesta adaptativa, evolutiva o de defensa y pueden o no estar restringidas a órdenes taxonómicos, a células especializadas y a fases específicas del desarrollo. No forman parte del metabolismo primario (proteínas, lípidos, carbohidratos, etc.), pero se biosintetizan a partir de moléculas intermediarias. Los MS identificados se cuentan en un número cercano a 100 mil y se considera que la cantidad aumenta en un aproximado de 4 mil cada año. Los grupos más representativos son los terpenoides (25,000), los alcaloides (12,000) y los fenoles (7,000) (Cruz *et al.*, 2009).

### **2.2.1 Metabolismo primario y secundario**

Las plantas pueden utilizar la energía solar, más el dióxido de carbono y el agua, para sintetizar moléculas complejas (carbohidratos como sacarosa y almidón) mediante la fotosíntesis, un proceso que genera energía química (ATP) para ser utilizada en el metabolismo celular. En las plantas, la glucosa derivada de esos carbohidratos produce piruvato de fosfoenol (a través del glucólisis) y malato (a través de la derivación de pentosa fosfato) (Álvarez, 2014).

Los MS se sintetizan a partir de metabolitos primarios mediante una secuencia de reacciones químicas catalizadas por enzimas, algunas de las cuales limitan la vía que define la síntesis y la cantidad de metabolito producido de acuerdo al estímulo externo al cual la planta se encuentre expuesta (Figura 3) (Álvarez, 2014).

El malato entra en la vía del shikimato para producir triptófano, del cual se originan los alcaloides indol y la fenilalanina (Álvarez, 2014).

La glucólisis tiene lugar en el citoplasma de la célula vegetal, el fosfoenol piruvato obtenido ingresa en la mitocondria y en su estroma produce piruvato, que se transforma en aceto acetil-CoA. La aceto acetil-CoA entra en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) en las crestas mitocondriales, completando el catabolismo de la glucosa a través de una serie de reacciones oxidativas, con la producción de dióxido de carbono y trifosfato de adenosina (ATP). Varias moléculas, intermedias en la síntesis de metabolitos secundarios, se producen en las diferentes etapas del TCA, prolina que origina alcaloides pirrólicos, ácidos grasos de los que derivan fosfolípidos, triacilglicerol, glucósidos, fenoles, mevalonato, ornitina y ácido cinámico. El mevalonato, mediante una serie de reacciones químicas intermedias, origina carotenoides, estigmasterol y terpenoides. La orinitina junto con la fenilalanina (procedente de la vía del shikimato) son los precursores de los alcaloides tropano, y el ácido cinámico origina los flavonoides y los lignanos (Figura 3) (Álvarez, 2014).

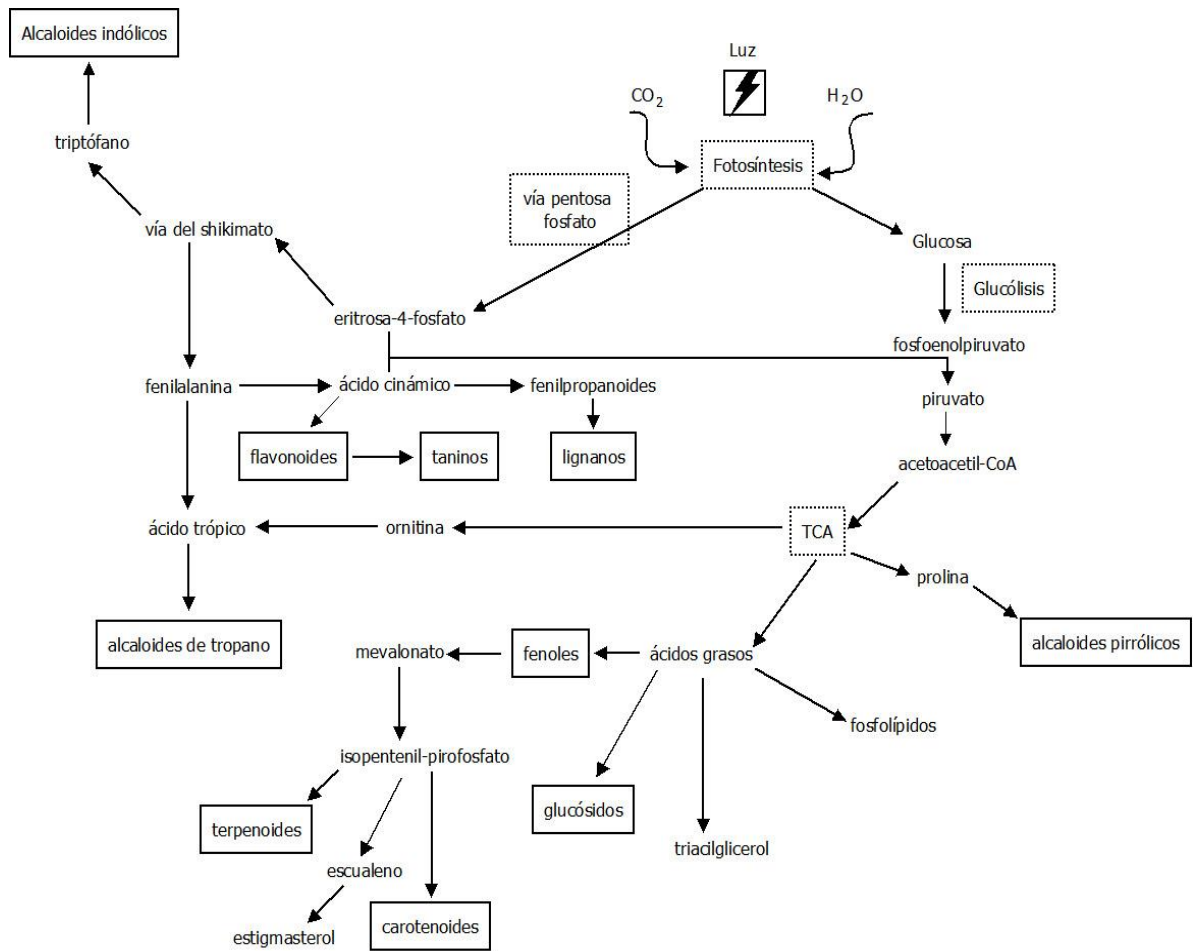


Figura 3. Esquema del metabolismo secundario y primario en plantas (Álvarez, 2014).

### 2.2.2 Aplicación comercial de los metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son los responsables de las cualidades organolépticas (sabor, color, olor y consistencia) de las plantas alimentarias y ornamentales. Estos compuestos representan una fuente renovable potencialmente ilimitada para el desarrollo de nuevos fármacos. De acuerdo a datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se han utilizado como fuente para la producción de fármacos aproximadamente entre 35, 000 y 70, 000 especies de plantas. Este número corresponde al 14-28% de las 250,000 especies de plantas que se estima existen en todo el mundo (Malik, 2017). Además, tienen aplicaciones comerciales en agroquímicos, colorantes, narcóticos, antibióticos, aceites comestibles, biodiesel,

esencias, saborizantes, insecticidas (Yazaki, 2004; Baser & Dermici, 2006; Luczkiewicz, 2008; Cruz *et al.*,2009). En la Tabla 4 se mencionan algunas aplicaciones a nivel comercial de MS obtenidos de plantas cultivadas de manera tradicional.

**Tabla 4. Metabolitos secundarios de origen vegetal con potencial a nivel comercial, producidos mediante cultivos o plantaciones tradicionales (Martínez, 2018).**

Producto	Aplicación	Especie
<i>Drogas/Químicos</i>		
<b>Antraquinonas</b>	Laxante	<i>Morinda citrifolia</i>
<b>Ajmalicina</b>	Tranquilizante	<i>Catharantus roseus</i>
<b>Taxol</b>	Anticancer	<i>Taxus brevifolia</i>
<b>Tebaina</b>	Codeína	<i>Nicotinaa tabacum</i>
<b>Ubiquinona-10</b>	Droga cardiaca	<i>Catharantus roseus</i>
<i>Saborizantes/ fragancias</i>		
<b>Vainilla</b>	Saborizante	<i>Vainilla planifolia</i>
<b>Cocoa</b>	Saborizante	<i>Theobroma cacao</i>
<b>Aceite de rosa</b>	Fragancia	<i>Rosa damascena</i>
<b>Mentol</b>	Fragancia	<i>Mentha piperita</i>
<b>Jasmín</b>	Fragancia	<i>Jasmin grandiflorum</i>
<i>Colorantes/pigmentos / edulcorante</i>		
<b>Antioianina</b>	Colorante	<i>Vitis vinifera</i>
<b>Azafrán</b>	Colorante	<i>Crocus sativus</i>
<b>Acido románico</b>	Antioxidante	<i>Coleus blumei</i>
<b>Esteviósido</b>	Edulcorante	<i>Stevia rebaudiana</i>

### 2.2.3 Terpenoides

Los terpenoides son hidrocarburos naturales producidos por una amplia variedad de plantas y animales. Se clasifican en base a cinco unidades de carbono (isopreno) como sus componentes básicos, con más de 55,000 moléculas descubiertas hasta la fecha. Los diferentes terpenos incluyen hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30) y politerpenos (> C30). Las diversas funciones funcionales de los terpenoides se han estudiado críticamente y se han aceptado. Algunos de ellos incluyen aditivos de sabor natural para alimentos o fragancias en perfumería y en medicinas tradicionales y alternativas como aromaterapia (Orhan, 2012; Gopal & Mérillon, 2013).



Biosintéticamente, los terpenoides se forman a través de dos vías sintéticas principales: la vía del ácido mevalónico (MVA), que es activa en el citosol, y de la vía plastidial del 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). Ambas vías conducen a la formación de las unidades C5 de isopentenil difosfato (IPP) y su isómero alílico dimetilalil difosfato (DMAPP), los componentes básicos de la biosíntesis de terpenoides (Orhan, 2012; Gopal & Mérillon, 2013).

En la segunda fase de la biosíntesis de terpenos, las preniltransferasas utilizan IPP y DMAPP en reacciones de condensación de cabeza a cola de estas dos unidades C5 para producir geranil difosfato (GPP), las posteriores adiciones de 1´4 o isopentenil difosfato para generar farnesilo (FPP) y geranilgeranil difosfato (GGPP), los precursores inmediatos de los monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos, respectivamente (Orhan, 2012; Gopal & Mérillon, 2013).

Estas reacciones son catalizadas por preniltransferasas de cadena corta, incluidas la GPP sintasa, FPP sintasa y GGPP sintasa. La GPP sintasa cataliza la reacción de condensación de IPP y DMAPP para formar GPP. La FPP sintasa agrega secuencialmente dos moléculas de IPP a DMAPP para formar el precursor difosfato C15 de sesquiterpenos y triterpenos, y GGPP sintasa agrega tres moléculas de IPP a DMAPP para formar el precursor difosfato C20 de diterpenos y tetraterpenos (Figura 4) (Orhan, 2012; Gopal & Mérillon, 2013).

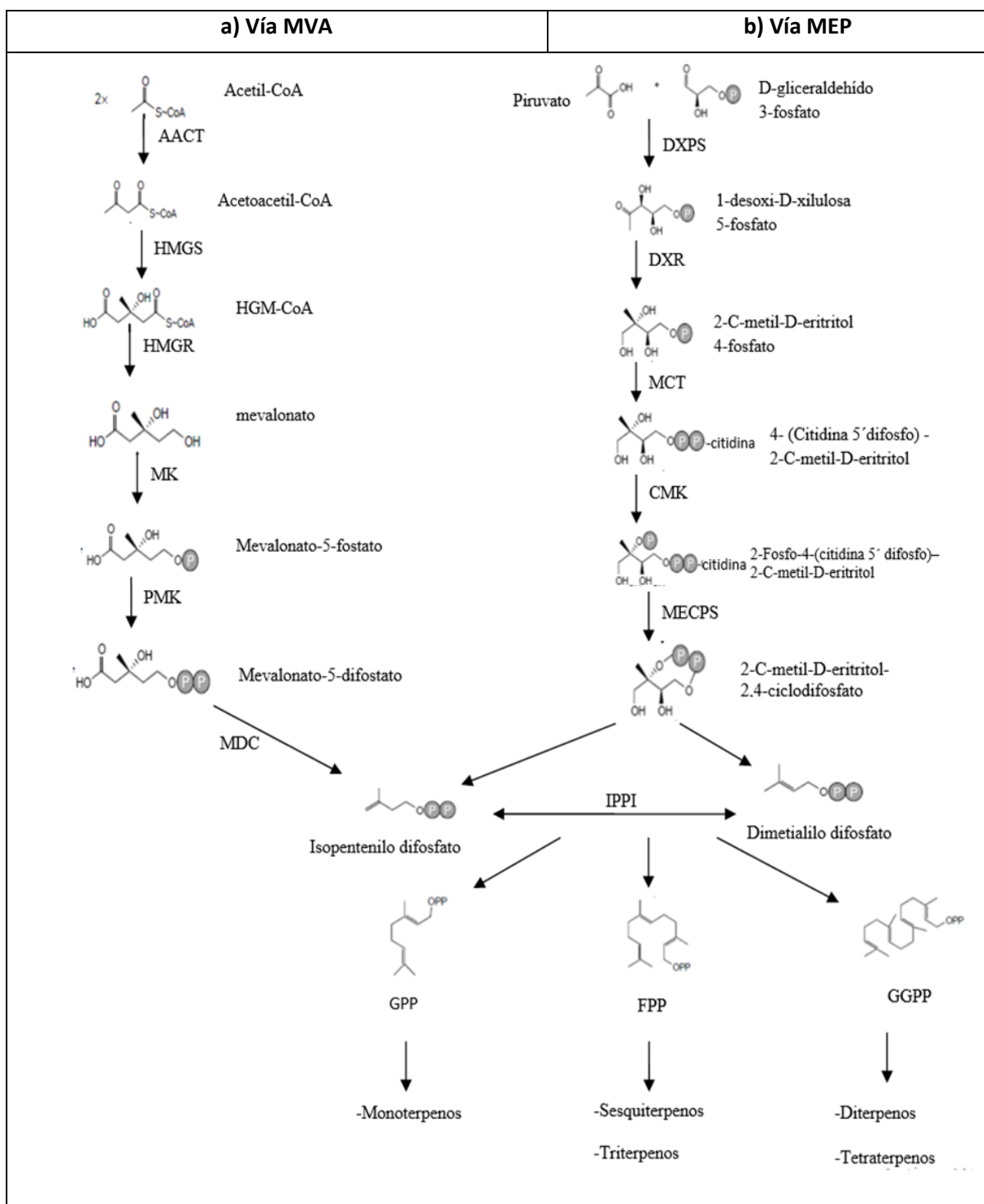


Figura 4. Rutas de biosíntesis para la producción de difosfato de isopentenilo (IPP) y difosfato de dimetialilo (DMAPP). La vía del mevalonato (izquierda) y la vía del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (derecha) (tomado y editado de Orhan, 2012).

### 2.2.3.1 Función de los terpenos en plantas

Los terpenos, también denominados isoprenoides, constituyen el grupo más abundante de los aceites vegetales; de hecho, son los responsables de los aromas y sabores específicos de las plantas, mientras mayor sea la cantidad de oxígeno en la molécula, mayor será su aroma. A pesar de que los terpenos están presentes en la gran mayoría de formas de vida, las plantas en particular, destacan por albergar una impresionante diversidad de estos compuestos, teniendo además una amplia heterogeneidad en cuanto a función y estructura. Dentro de los terpenos se clasifica a los carotenoides que son tetraterpenos muy importantes en los mamíferos, especialmente el  $\beta$ -caroteno que es precursor de la vitamina A (11-cis-retinal). También las vitaminas liposolubles D (colecalciferol) y K son consideradas como terpenos (Espinosa *et al.*, 2016). En la Tabla 5 se resumen las funciones primordiales de estos compuestos en las plantas.

**Tabla 5. Función de algunos terpenoides en la planta**

Función	Sustancia	Referencia
<b>Reguladores de crecimiento</b>	Giberelinas, ácido abscísico	(Espinosa <i>et al.</i> , 2016)
<b>Pigmentos fotosintéticos</b>	Fitol, carotenoides	(Arias, 2013; Espinosa <i>et al.</i> , 2016)
<b>Transportadores de electrones</b>	Ubiquinona, plastoquinona	(Espinosa <i>et al.</i> , 2016)
<b>Componentes de membrana</b>	Esteroles	(Ferrer <i>et al.</i> , 2017)
<b>Compuestos de defensa</b>	Fitotoxinas, repelentes, antibióticos de herbívoros	(Almeyda, 2017)
<b>Quimioatrayentes de polinizadores</b>	Sesquiterpenos, Monoterpenos	(Boncan <i>et al.</i> , 2020)

### 2.2.3.2 Importancia comercial de los terpenos

Muchos de los terpenoides son comercialmente de interés debido a su uso como saborizantes y fragancias en alimentos y cosméticos (por ejemplo, mentol, nootkatona y sclareol) o porque son importantes para la calidad de los productos agrícolas, como el sabor de las frutas y la fragancia de las flores (por ejemplo, el linalol) (Orhan, 2012). Además, los terpenoides pueden tener propiedades medicinales tales como anticancerígeno, antioxidante y antifúngico (por ejemplo, el geraniol), anticancerígeno, (por ejemplo, el linalol y limoneno), actividad antipalúdica (por ejemplo, artemisinina), antiulcerosa, hepática, antimicrobiana o diurética (por ejemplo, glicirricina) (Orhan, 2012). En la Tabla 6 se mencionan algunas especies de plantas productoras de terpenos con aplicaciones farmacológicas:

**Tabla 6. Terpenos de aplicación comercial (Álvarez, 2014)**

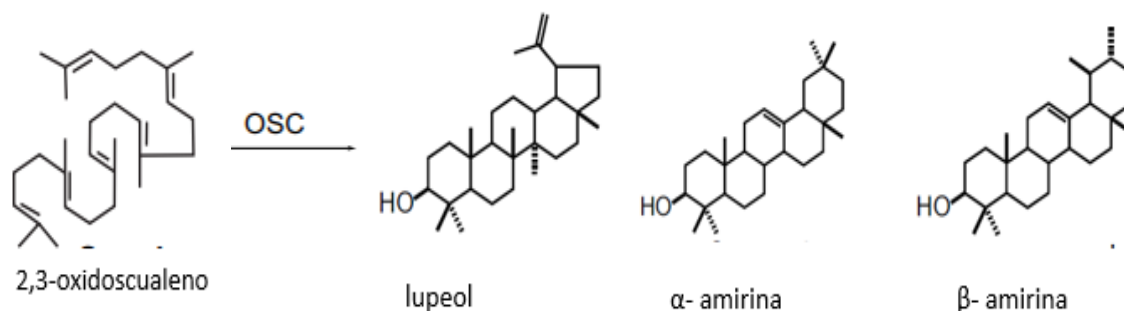
<b>Terpeno</b>	<b>Especie vegetal</b>	<b>Actividad farmacológica</b>
<b>Cariofileno</b>	<i>Syzygium aromaticum</i> , <i>Cannabis sativa</i>	Antiinflamatorio
<b>Santonina</b>	<i>Artemisia maritima</i>	Antiparasitaria
<b>Artemisinina</b>	<i>Artemisia annua</i>	Antimalaria
<b>Taxol</b>	<i>Taxus brevifolia</i>	Actividad antitumoral
<b>Diosgenina</b>	<i>Dioscorea</i> spp, <i>Solanum</i>	Síntesis de hormonas
<b>solasodina</b>	<i>eleagnifolim</i>	esteroides
<b>Glucósidos digitálicos</b>	<i>Digitalis lanata</i>	Cardiotónico

Los terpenoides biológicamente activos abarcan varios órdenes de magnitud. El más estudiado es el efecto de los terpenos en la prevención y el tratamiento del cáncer. De manera ilustrativa, el derivado de taxol (paclitaxel y docetaxel) se encuentran entre los fármacos más utilizados en la quimioterapia del cáncer. Otros usos terapéuticos importantes de los terpenoides incluyen antimicrobiano (West *et*

*al.*, 2012), antifúngico (Hammer *et al.*, 2003), antivírico (Astani *et al.*, 2010), antihiper glucémico (Paduch *et al.*, 2007), antioxidante (Quesada *et al.*, 2011) inmunomodulador (Carrasco *et al.*, 2009) y como potenciador de la permeabilidad cutánea (Williams & Barry, 1991). Dado que muchas de estas moléculas solo se encuentran en niveles muy bajos en la naturaleza, su recolección masiva para obtener cantidades suficientes de la droga, incluida la biología sintética y la ingeniería metabólica, proporciona enfoques innovadores para aumentar la producción de terpenoides (Gopal & Mérillon, 2013).

### 2.2.3.3 Triterpenos pentacíclicos

Los esqueletos de triterpenos pentacíclicos ( $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina y lupeol) se ciclan a partir de 2,3-oxidoscualeno, un precursor común de fitoesteroles y triterpenoides. Las enzimas involucradas en la formación de estas cadenas principales de triterpenos se denominan generalmente oxidoscualeno ciclasas (OSC) (Figura 5) (Huang *et al.*, 2012).



**Figura 5. Biosíntesis de triterpenos pentacíclicos a partir de 2,3-oxidoscualeno**

Los triterpenos pentacíclicos (TP) son unos de los productos biológicamente activos más importantes de origen natural, están ampliamente distribuidos por todo el reino vegetal. La  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina y lupeol son tres miembros representativos de la familia de los TP, y recientemente han atraído mucha atención debido a su actividad hepatoprotectora, antihiper glucémica, hipolipidémica (Chen *et al.*, 2017).

### 2.2.3.3.1 Lupeol

El lupeol es un TP con fórmula química  $C_{30}H_{50}O$ , punto de fusión de 215-216 ° C y peso molecular de 426,7174 (g/mol) (Sharma *et al.*, 2020). Es un compuesto presente en diferentes plantas medicinales con una amplia gama de bioactividades, que sugieren sus útiles propiedades medicinales con diversidad de acción frente a diferentes enfermedades (Tabla 7) (Laghari *et al.*, 2011). Se distribuye comúnmente en el reino vegetal y se encuentra en frutas y verduras comestibles como pulpa de mango, raíz de zanahoria, semillas de melón y soja, uva y aloe, entre otras. El lupeol también se encuentra en abundancia en plantas medicinales como la planta de manteca de karité (Mendez & Lope 1991), *Tamarindus indica* (Kabir *et al.*, 2008), *Celastrus paniculatus* (Sharma *et al.*, 2014), *Zanthoxylum riedelianum* (Mandalho *et al.*, 2007), *Allanblackia monticola* (Nguemfo *et al.*, 2009), *Himatanthus sucuuba* (Wood *et al.*, 2001), *Leptadenia hastata* (Nikiema *et al.*, 2001), *Crataeva nurvala* (Shirwaikar *et al.*, 2004), *Bombax ceiba* (You *et al.*, 2003), *Sebastiania adenophora* (Saeidnia *et al.*, 2015). Los estudios de cuantificación han demostrado que el lupeol está presente en el olivo (3 µg/g), el mango (1.80 µg/g de pulpa), la hoja de aloe (280 µg/g de hoja seca), la planta de olmo (800 µg/g de corteza), pera japonesa (175 µg/g de corteza de ramita) y aceite de Ginseng (15.2 mg/100g de aceite) (Siddique & Saleem, 2011).

Tabla 7. Actividades farmacológicas del lupeol

Actividad farmacológica	Referencia
Antiprotozoaria Antiinflamatoria Antitumorales Cardioprotectora Hepatoprotectora Antimicrobiana	Gallo & Sarachine, 2009
Antiurolitiásica	Sunitha <i>et al.</i> , 2001
Antimicrobiana Anticancerígeno Nefroprotectora	Siddique & Saleem, 2011
Antiurolitiática	Anand <i>et al.</i> , 1994
Antiartrítica	Kweifio <i>et al.</i> , 1995
Antidiabética	Lakshmi <i>et al.</i> , 2014

### 2.2.3.3.2 $\alpha$ -amirina y $\beta$ -amirina

Las amirinas son importantes triterpenoides pentacíclicos de plantas, que incluyen los dos isómeros  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina, que difieren sólo en la posición del grupo metilo en el esqueleto de triterpenos. La  $\alpha$ -amirina y la  $\beta$ -amirina presentan actividades fisiológicas y farmacológicas importantes (Tabla 8) (Yu *et al.*, 2018). Se pueden encontrar en el copal mexicano, *Taraxacum officinale* y gayuba (Ramos *et al.*, 2018).

**Tabla 8. Actividades farmacológicas de  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina**

Actividad farmacológica	Referencia
Gastroprotectora	Ramos <i>et al.</i> , 2018
Antihiperglucemiante	
Antimicrobianas	
Antiinflamatoria	Melo <i>et al.</i> , 2011
Hepatoprotectora	
Antinociceptiva	Soldi <i>et al.</i> , 2008
Antidepresiva	Holanda <i>et al.</i> , 2008
Antipruriginosa	Santos <i>et al.</i> , 2012

Los métodos tradicionales de obtención de amirinas eran la extracción y separación química, pero su aplicación se vio seriamente restringida por el lento crecimiento de las plantas, las preocupaciones ambientales, el alto consumo de energía y los costos de producción. La biología sintética y la ingeniería metabólica podrían rediseñar y construir toda la ruta metabólica, ensamblar diferentes genes en microbios para producir productos objetivo de manera eficiente, que podría emplearse para mejorar la productividad de las amirinas para satisfacer la demanda del mercado (Yu *et al.*, 2018).

En comparación con los métodos tradicionales, la biosíntesis tiene muchas ventajas, como bajo costo, tiempos de ciclo cortos, amigable con el medio ambiente, eficiencia y sostenibilidad. Hasta ahora, se han reportado muchos casos exitosos de productos naturales con importante actividad fisiológica y farmacológica

derivados de plantas y sintetizados con *Saccharomyces cerevisiae*, incluyendo mono-, sesqui-, di y triterpenoides (Yu *et al.*, 2018).

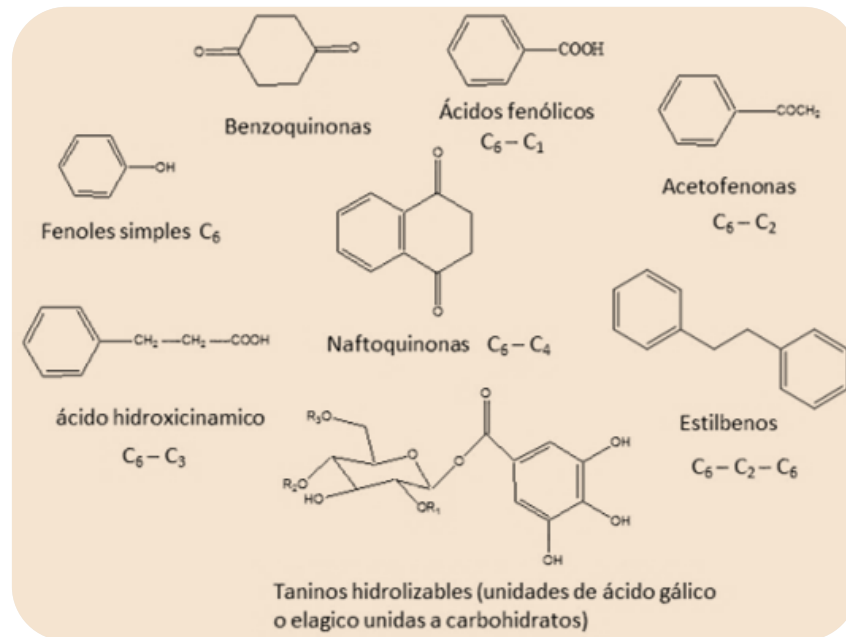
#### **2.2.4 Polifenoles**

Los compuestos polifenólicos son metabolitos secundarios de las plantas que están diseñados con un anillo aromático, que lleva uno o más restos hidroxilo, varias clases pueden considerarse de acuerdo con el número de anillos de fenol y a los elementos estructurales que se unen a estos anillos (Vázquez, 2014).

Los compuestos polifenólicos varían ampliamente en estructura, desde los más simples (monómeros y oligómeros) hasta los polímeros complejos de peso molecular alto (taninos). Se han identificado más de 4000 compuestos polifenólicos individuales, los cuales se han dividido en dos grandes grupos: los flavonoides y los no flavonoides. Estos últimos incluyen a las moléculas más sencillas, como los ácidos fenólicos con esqueletos químicos de seis carbonos (C6), ligados o no con esqueletos de dos hasta cuatro carbonos (C6-C4) (Vázquez, 2014).

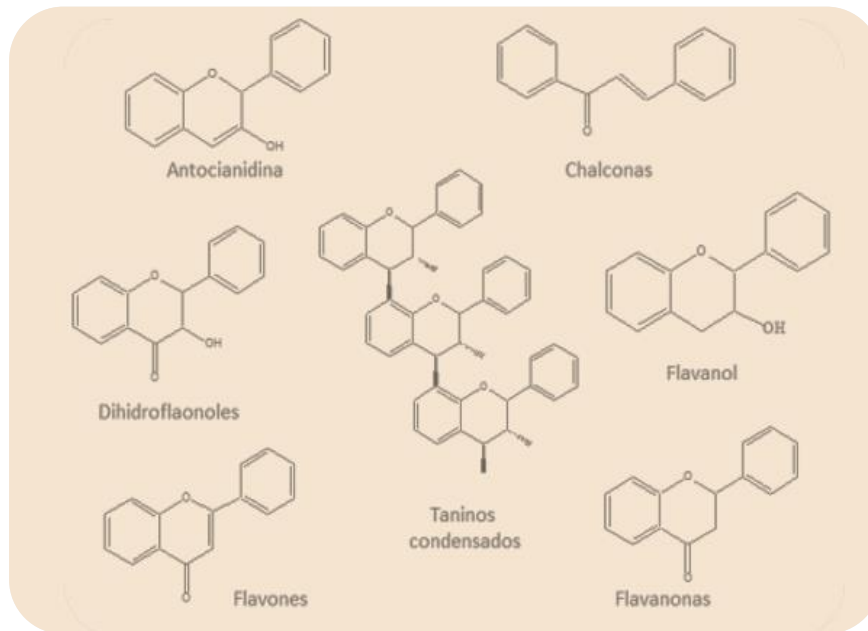
Ejemplos más complejos de compuestos no flavonoides son aquellos cuyos esqueletos poseen su porción C6 unida a porciones C2 y a otro anillo C6, como en el caso de los estilbenos, galotaninos o elagitaninos. Estos últimos son conocidos como taninos hidrolizables, los más complejos de los fenoles no flavonoides. En la Figura 6 se muestra la estructura química de compuestos polifenólicos no flavonoides (Vázquez, 2014).





**Figura 6. Estructura química de compuestos polifenólicos no flavonoides (Vázquez, 2014).**

Los polifenoles flavonoides tienen un esqueleto químico que consta de tres porciones: dos anillos aromáticos y un anillo heterocíclico oxigenado ( $C_6-C_3-C_6$ ). Los flavonoides conforman el grupo más variado estructuralmente, debido a que su esqueleto base tiene numerosas posibilidades de sustitución por grupos hidroxilo (-OH), metoxilo (-O-CH<sub>3</sub>), acilo (-CO), y glucósidos. Algunos compuestos flavonoides y sus estructuras químicas básicas se muestran en la Figura 7 (Vázquez, 2014).



**Figura 7. Estructura química de compuestos polifenólicos de tipo flavonoides (Vázquez, 2014).**

#### **2.2.4.1 Funciones de los polifenoles en plantas**

Los polifenoles tienen probablemente la mayor capacidad para cumplir múltiples funciones en plantas expuestas a una amplia gama de estreses abióticos. De hecho, en cada especie individual están presentes enormes cantidades de estructuras fenólicas, distribuidas en diferentes órganos, células y compartimentos subcelulares. Los polifenoles, como los glucósidos fenólicos, los derivados del ácido hidroxicinámico y los flavonoides, intervienen en el engrosamiento de la pared celular secundaria, lo que aumenta mecánicamente el refuerzo de los tejidos, una característica anatómica clave que confiere tolerancia a la sequía. Además, el fortalecimiento de la pared celular inducido por polifenoles junto con funciones relacionadas con sustancias químicas, también puede mejorar la resistencia al estrés oxidativo de origen tanto abiótico como biótico (Di Fernando *et al.*, 2014).

Recientemente se ha demostrado que la biosíntesis de polifenoles aumenta abruptamente en las plantas en respuesta a la luz solar intensa en ausencia de irradiación ultravioleta o después de la privación de nitrógeno/ agua, calor/ frío y salinidad de la zona radicular. Los polifenoles pueden actuar como filtros no solo de la radiación UV sino también de la radiación visible de onda corta (por ejemplo, elagitaninos y antocianinas). Los polifenoles localizados en las vacuolas (por ejemplo, derivados del ácido cafeico, derivados de quercetina, antocianinas) pueden reducir el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que se supone que se difunde del cloroplasto a la vacuola en exceso de condiciones de estrés leve. Vale la pena señalar que la vacuola no posee un sistema de defensa antioxidante eficaz, por ejemplo, el ácido ascórbico no es un buen sustrato para las peroxidasas vacuolares (POX). Por lo tanto, los flavonoides de localización vacuolar pueden constituir un sistema de desintoxicación de  $H_2O_2$  (junto con POX) de importancia primaria en plantas que sufren de estrés lumínico excesivo severo (Di Ferdinando *et al.*, 2014).

Los polifenoles participan en la transducción de señales desde la raíz hasta el brote y ayudan en la movilización de nutrientes. Los exudados de las raíces contienen compuestos fenólicos que alteran las propiedades fisicoquímicas de la rizosfera.

Los microbios del suelo transforman los compuestos fenólicos en compuestos que ayudan en la mineralización del N y la formación de humus (Sharma *et al.*, 2019).

Los fenólicos vegetales, como reguladores fisiológicos o mensajeros químicos, inhiben el catabolismo del AIA (flavonoides dihidroxi del anillo B) o limitan la síntesis del AIA (flavonoides monohidroxi del anillo B). Algunos compuestos fenólicos (ácido transcinámico, cumarina, ácido p-hidroxibenzoico y ácido benzoico) pueden ser potencialmente fitotóxicos si se acumulan en grandes cantidades y pueden inhibir la germinación y el crecimiento de las plántulas debido a la alteración del funcionamiento de las enzimas celulares y al deterioro de las células. Por ejemplo, algunos compuestos fenólicos inhiben la enzima prolil aminopeptidasa y fosfatasa que participan en la germinación de semillas en leguminosas. Por el contrario, se ha informado que los altos contenidos de ácido fenólico ejercen efectos positivos en la germinación de semillas (Sharma *et al.*, 2019).

#### 2.2.4.2 Bioactividades de los polifenoles

Los polifenoles han mostrado beneficios para la prevención y el tratamiento de numerosas enfermedades (Tabla 9).

**Tabla 9. Actividades farmacológicas de los polifenoles**

<b>Actividad farmacológica</b>	<b>Referencias</b>
<b>Anticancerígena</b>	Karou <i>et al.</i> , 2005
<b>Antimutagénicas</b>	
<b>Cardioprotectora</b>	
<b>Antitrombosis</b>	Ansari <i>et al.</i> , 2019
<b>Antihipertensiva</b>	
<b>Antiinflamatoria</b>	
<b>Hipoglucemiante</b>	Wang <i>et al.</i> , 2019
<b>Antiviral</b>	
<b>Antiaterosclerótica</b>	Pietta, 2003
<b>Antimicrobiana</b>	
<b>Antiosteoporótica</b>	Li <i>et al.</i> , 2014
<b>Antienvjecimiento</b>	
<b>neuroprotectora</b>	

### **2.2.4.3 Rutina, Isoquercetina y quercetina**

La quercetina es un flavonoide típico de tipo flavonol, que se encuentra principalmente en lechuga (40,27 mg/100 g), pimienta (32,59 mg/100 g), cebolla (12,65-17,22 mg/100g), chokeberry negro (8,90 mg/100 g), tomate (4,56 mg/100 g), brócoli (4,25 mg/100 g) y manzana (2,47 mg/100 g). La quercetina está presente principalmente en forma de glucósidos, como la rutina (quercetina-3-O-rutinósido, rutósido); la rutina se encuentra ampliamente en numerosas frutas y verduras como el trigo sarraceno (200-1000 mg/100 g), uvas, manzanas, bayas, cítricos, alcaparras, cebollas y espárragos. Sin embargo, también se ha reportado rutina en algunas plantas medicinales, como *Ruta graveolens* L, *Sophora japonica* L. y *Eucalyptus* spp. Existe una evidencia creciente que sugiere que la quercetina y la rutina están dotadas de propiedades farmacológicas, sin embargo, la principal preocupación asociada con el consumo de quercetina y rutina es su biodisponibilidad oral generalmente pobre, debido a su baja solubilidad acuosa, mala estabilidad química y metabólica, y permeabilidad de membrana restringida (Luca *et al.*, 2019).

La isoquercetina es un derivado glucósido de la quercetina (Qin *et al.*, 2018). Como glucósido flavonoide natural, la isoquercitrina se distribuye en muchas plantas, verduras, hierbas y flores (Cao *et al.*, 2017; Qin *et al.*, 2018). Recientemente, la isoquercetina ha atraído la atención como un compuesto prometedor porque tiene una mayor solubilidad (95 mg/L) que la quercetina en agua. La producción de isoquercetina se puede maximizar junto con quercetina durante la hidrólisis de la rutina (Kim *et al.*, 2017).

#### **2.2.4.3.1 Bioactividades de Rutina, Isoquercetina y quercetina**

La quercetina-3-O-rutinósido (rutina), la quercetina-3-glucósido (isoquercetina) y la quercetina tienen propiedades antioxidantes, citoprotectoras, vasoprotectoras, antiproliferativas y antiinflamatorias (Zúñiga *et al.*, 2016).

Existe una evidencia creciente que sugiere que la quercetina y la rutina están dotadas de propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antibacterianas, protectoras cardiovasculares y neuroprotectoras prometedoras. Además, la rutina (500-2000 mg/día) se prescribe con bastante frecuencia en el tratamiento de algunas enfermedades vasculares, como venas varicosas, hemorragias internas o hemorroides (Luca *et al.*, 2019). La isoquercetina exhibe una gama de propiedades medicinales que incorpora la captación de radicales y atenúa el estrés oxidativo, antiinflamatorio, antidiabético, neuroprotector y antidepresivo (Jayachandran *et al.*, 2019).

### **2.3 Cultivo *in vitro* para producción de metabolitos secundarios**

Comúnmente, los metabolitos secundarios (MS) se extraen de plantas silvestres o cultivadas, lo que tiene una serie de desventajas. Su acumulación en las plantas es baja, ya que está regulada espacial y temporalmente. Es decir, ocurre en células, órganos y tejidos específicos, en fases determinadas del ciclo de vida de la planta, bajo condiciones estacionales o de estrés, por lo que el rendimiento final es muy bajo y no sustentable ni sostenible (Verpoorte *et al.*, 2002). Otro factor que influye mucho en la extracción de MS es que puede existir alta variabilidad entre poblaciones e inclusive entre individuos. Además la explotación comercial de plantas está basada en la recolección de material en su hábitat natural, frecuentemente incluyendo la raíz, lo que ha provocado que muchas estén amenazadas o en peligro de extinción (Sottomayor *et al.*, 2004), como es el caso de *C. filaginoides* donde su sobreexplotación a llevado a que sea una especie en riesgo de peligro de extinción, por tal motivo es importante la búsqueda de nuevas alternativas que permitan satisfacer la demanda comercial de la misma, con el objetivo de cuidar al mismo tiempo su preservación. La técnica de cultivo *in vitro* es una alternativa viable para obtener una amplia disponibilidad de la planta, además de que, a condiciones controladas permite la posibilidad de obtener compuestos bioactivos de interés comercial al igual que la planta silvestre.

De manera general las principales ventajas de la producción de MS a través de cultivos celulares sobre la producción convencional del cultivo de plantas, son las siguientes:

- Independencia de los factores ambientales y variaciones estacionales, ya que la producción de metabolitos secundarios bioactivos económicamente valiosos se lleva a cabo en condiciones controladas eliminando la influencia negativa de factores físicos (cambios estacionales) y biológicos (contaminación por microorganismos o insectos).
- Permite la selección de líneas celulares de alto rendimiento y un sistema de producción definido que garantiza una calidad uniforme y un suministro y rendimiento continuos del producto.
- Los principios activos generados pueden ser recuperados eficientemente y con tecnología no contaminante.
- Permite la producción de compuestos nuevos, que normalmente no sintetiza la planta alterando la ruta metabólica establecida o sometiendo al callo a condiciones de estrés.
- Permite incrementar la formación de compuestos bioactivos, alterando la ruta metabólica establecida.
- Permite la obtención de plantas completas genéticamente homogéneas, así como de células productoras de sustancias activas bajo condiciones asépticas, evitando con ello la sobreexplotación y extinción de especies vegetales objeto de interés.
- Ayuda a la conservación de algunas plantas silvestres difíciles de cultivar
- Por otra parte, es útil para la producción de productos naturales que son demasiado complejos para ser sintetizados químicamente.
- Los sistemas de cultivo de células vegetales representan una fuente potencial y renovable de valiosos compuestos medicinales, sabores, fragancias y colorantes (Caraballo *et al.*, 2015; Sharry, 2015; Siddiqui *et al.*, 2017; Egamberdieva *et al.*, 2019; Mohanlall, 2020).

Limitación de la producción de MS por cultivo *in vitro* de tejidos vegetales:

La producción *in vitro* de metabolitos secundarios se ve obstaculizada por el conocimiento insuficiente de las vías biosintéticas que conducen a una producción errática. Para la ingeniería racional de las vías metabólicas, se necesita un conocimiento profundo de las vías biosintéticas totales y sus mecanismos reguladores que controlan el inicio y el flujo de las vías. Hasta la fecha, solo unas pocas vías (p. ej., Alcaloides de terpenoides, flavonoides, indol e isoquinolina en el sistema vegetal se conocen bien como resultado de varios años de investigación bioquímica clásica (Siddiqui *et al.*, 2017), sin embargo, en los últimos años el cultivo de tejidos vegetales ha sido utilizado también como material experimental para la biosíntesis de ingredientes activos mediante la ingeniería genética y metabólica (Siddiqui *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Leal *et al.*, 2018; Niazi *et al.*, 2019).

### **2.3.1 Principio del cultivo de células vegetales**

El cultivo de células y tejidos vegetales se basa en el principio de totipotencia celular, que establece que a partir de cualquier célula de una planta es posible regenerar un individuo completo (Trejo *et al.*, 2007), estos cultivos integran un conjunto de metodologías especializadas usadas para cultivar explantes (segmento de la planta, ya sea una sola célula, un tejido o un órgano) en forma estéril con medios nutritivos sólidos o líquidos, a los que se les adicionan reguladores de crecimiento vegetal (Villareal *et al.*, 2014; Tripathi *et al.*, 2019) y son mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura, luz y humedad. El cultivo de células vegetales es una herramienta biotecnológica por medio de la cual es posible obtener cultivos de células no diferenciadas, como callos y suspensiones celulares, además de cultivos de órganos como brotes y raíces (Zhao *et al.*, 2005). El cultivo de callo y suspensión pueden jugar un papel importante en la producción a gran escala de metabolitos secundarios bioactivos a partir de plantas (Akhtar & Swamy *et al.*, 2019).

## **2.3.2 Tipos de cultivo *in vitro* de células vegetales**

Los cultivos *in vitro* de células vegetales pueden ser no diferenciados como los callos y las suspensiones, o diferenciados como las raíces y los tallos (Busto, 2010):

### **2.3.2.1 Cultivos de callos**

Los callos son agregados de células proliferantes no especializadas que crecen en medios semisólidos en presencia de carbohidratos, sales minerales, vitaminas y aminoácidos, y que son suplementados con reguladores de crecimiento vegetal (RCV) del grupo de las auxinas y las citocininas. Estas últimas son las responsables de mantener el crecimiento no diferenciado (Villareal *et al.*, 2014).

La formación de callo a partir de un explante depende principalmente de la composición de reguladores de crecimiento celular en el medio de cultivo; auxinas y citoquininas. Un balance adecuado de auxina y citoquinina promueve la inducción de callos, mientras que una proporción alta de auxina o citoquinina induce la regeneración de raíces o brotes (Ikeuchi *et al.*, 2013; Martínez, 2018).

Los callos crecen bajo condiciones estériles y usualmente se inducen a partir de tejidos jóvenes de la planta. En teoría es posible obtener callos de todas las especies vegetales; sin embargo, las condiciones óptimas para su crecimiento dependen de cada especie y requieren ser determinadas. Los callos pueden variar en su textura, desde duros y compactos, a tejidos friables. Los tejidos callosos constituyen el material primario que permitirá establecer cultivos de células en suspensión (Villareal *et al.*, 2014). Los callos obtenidos también pueden subcultivarse para mantenimiento y propagación o inducir la diferenciación para formar órganos (organogénesis), embriones (embriogénesis).

El cultivo de callos puede ser una alternativa para la obtención de MS lo que podría permitir la producción a gran escala de dichos compuestos que presentan actividad biológica. En la Tabla 10, se presentan algunos reportes de especies vegetales productoras de metabolitos secundarios por tal técnica:



**Tabla 10. Metabolitos secundarios producidos mediante cultivos de callo de diversas especies de plantas**

<b>Especie vegetal</b>	<b>Ingrediente activo</b>	<b>Medio de cultivo y RCV</b>	<b>Referencias</b>
<b><i>Capsicum annuum</i></b>	Capsiacina	MS + 2,4-D+ GA <sub>3</sub>	Varindra <i>et al.</i> , 2000
<b><i>Aspidosperma ramiflorum</i></b>	Ramiflorina	(MS + 2-4, D + BAP + Sacarosa)	Olivira <i>et al.</i> , 2001
<b><i>Salvia officinalis</i></b>	Terpenoides	(MS + 2,4-D + BAP)	Santos Gomes <i>et al.</i> , 2002
<b><i>Rheum ribes</i></b>	Catequina	(MS + IBA + BA)	Farzami y Ghorbant, 2005
<b><i>Vaccinium myrtillus</i></b>	Flavonoides	(MS + BAP + NAA)	Hohtola <i>et al.</i> , 2005
<b><i>Centella asiatica</i></b>	Asiaticósido	(MS + 2,4-D + KIN)	Kiong <i>et al.</i> , 2005
<b><i>Rauvolfia tetraphylla</i></b>	Reserpina	(MS + 2,4-D + Triptófano)	Anitha y Kumari, 2006
<b><i>Gymnema sylvestre</i></b>	Ácido gimnémico	(MS + IAA + BA)	Devi <i>et al.</i> , 2006
<b><i>Gymnema sylvestre</i></b>	Ácido gimnémico	(MS + 2,4-D + IAA)	Gopi y Vatsala., 2006
<b><i>Cassia senna</i></b>	Senósidos	(MS + NAA + KIN)	Shrivastava <i>et al.</i> , 2006
<b><i>Saprosma fragrans</i></b>	Antraquinona	(MS + 2,4-D + NAA)	Singh <i>et al.</i> , 2006
<b><i>Momordica charantia</i></b>	Flavonoide	(MS + BAP + NAA)	Agarwal y Kamal, 2007
<b><i>Zataria multiflora</i></b>	Ácido rosmarínico	(MS + IAA + KIN)	Francoise <i>et al.</i> , 2007
<b><i>Pluchea lanceolata</i></b>	Quercetina	(MS + NAA + BAP)	Arya <i>et al.</i> , 2008
<b><i>Artemisia annua</i></b>	Artemisinina	(MS + NAA + KIN)	Baldi y Dixit, 2008
<b><i>Coscinium fenestratum</i></b>	Berberina	(MS + 2,4-D + BAP)	Khan <i>et al.</i> , 2008
<b><i>Crataegus sinaica</i></b>	Flavonoide	(MS + 2,4-D + NAA + BAP)	Maharik <i>et al.</i> , 2009
<b><i>Withania somnifera</i></b>	Lactona esteroidal	(MS + 2,4-D + BA)	Mirjalili <i>et al.</i> , 2009
<b><i>Camellia chinensis</i></b>	Flavonas	(MS + 2,4-D + NAA)	Nikolaeva <i>et al.</i> , 2009

### 2.3.2.2 Cultivos de células en suspensión

Cuando un callo friable o porción de este se transfiere a un medio de cultivo líquido y se pone en agitación constante, los aglomerados se disgregan liberándose células independientes o pequeños agregados de ellas lo que da origen a las suspensiones celulares. Estas suspensiones se mantienen por subcultivos periódicos en medios de cultivo fresco (Busto, 2010).

En el cultivo en suspensión las células están de forma individual distribuidas homogéneamente en el medio de cultivo líquido, lo que facilita la transferencia de nutrientes y oxígeno hacia el citoplasma, así se proporciona un cultivo uniforme, eliminando los gradientes de nutrientes que se presentan en los cultivos en medio sólido y garantizando la disponibilidad de nutrientes para todas las células. Adicionalmente, las condiciones cultivo como pH, oxígeno disuelto y temperatura se hacen más fáciles de controlar en este tipo de cultivo (Arias *et al.*, 2009; Orozco *et al.*, 2011; Martínez, 2018).

Los procesos industriales actuales se basan en cultivos de células en suspensión para después iniciar el escalamiento a biorreactores, con lo que se busca la producción de los metabolitos bioactivos a mayor escala. Al mismo tiempo, este tipo de cultivo se utiliza para manipular células a semillas artificiales encapsulándolas dentro de un material inerte, o también, para en otra etapa modificar el medio de cultivo e inducir la propagación masiva de la especie. Esta propagación *in vitro* de plantas tiene un enorme potencial para la producción de medicamentos a base de plantas de alta calidad y se puede lograr a través de micropropagación. La regeneración de plantas a partir de brotes, tallos y meristemas ha dado resultados alentadores. Al mismo tiempo, ya sea para la producción *in vitro* de los metabolitos o para la propagación masiva de las plantas medicinales, un screening, selección y optimización del medio de células en suspensión puede resultar en un incremento de 20 a 30 veces en las concentraciones de los compuestos bioactivos, en comparación con las plantas silvestres. Existen diferentes métodos para inducir que

estas células vegetales incrementen su producción de MS, como puede ser la inmovilización celular, la elicitación o la permeabilización (Domínguez, 2015).

### **2.3.3 Condiciones de un cultivo *in vitro***

Durante el cultivo de tejidos de plantas medicinales, una serie de factores influyen en el crecimiento de los tejidos y la síntesis de los metabolitos secundarios objetivo, como temperatura, luz, pH, tipo de medio de cultivo, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, entre otros (Wang *et al.*, 2017), por lo cual es de vital importancia el control de cada uno de estos. A continuación, se presenta una breve descripción de algunos de estos factores y su importancia en el cultivo de tejidos vegetales.

#### **2.3.3.1 Esterilidad**

El cultivo de las especies vegetales *in vitro* debe mantenerse altamente desinfectado y libre de agentes patógenos, en lo posible, las condiciones tienen que ser óptimas para evitar que los cultivos puedan contaminarse, por lo que regularmente debe realizarse una desinfección minuciosa dentro del laboratorio al igual que un monitoreo del ambiente que permita conocer la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) tanto bacterianas como fúngicas que puedan existir en las diferentes áreas (Cortes *et.al.*, 2017).

#### **2.3.3.2 Temperatura**

La temperatura ideal para el crecimiento de cultivos vegetales por lo general puede oscilar entre los 25 – 30 °C, ideal para que el crecimiento de estos tejidos se pueda dar. Como lo demuestran algunos estudios en los que se cultivaron las especies *Populus tremula* y *Swietenia macrophylla*, dada la especificidad que estas plantas requieran (Cortes *et.al.*, 2017).

### **2.3.3.3 Humedad relativa**

Los cultivos vegetales *in vitro* necesitan una humedad relativa entre el 50% y el 80% frente al ambiente, para que la planta pueda desarrollarse. Según el tipo de características que requiera la planta la humedad puede variar, algunos estudios muestran como *Ocimum basilicum* (albahaca) requiere una humedad relativa entre el 70% y el 80% mientras que, para otros tipos de cultivos, como en el caso del *Coffea arabica* (café), la humedad relativa varía entre el 50% y 60% (Cortes *et.al.*, 2017).

### **2.3.3.4 Ciclo de luz**

Usualmente las plántulas crecidas *in vitro* deben permanecer durante 18 horas en un ciclo de luz constante y 6 horas de oscuridad para que puedan realizar el intercambio de luz necesario para su crecimiento, como, por ejemplo, en el caso del cultivo de *Ocimum basilicum* (albahaca) se emplea principalmente un fotoperíodo de luz como el que se mencionó antes, al igual que el recomendado por la Organización de las Naciones Unidas (Cortes *et.al.*, 2017).

### **2.3.3.5 Nivel de acidez (pH)**

Debe oscilar entre 5.6 y 5.8 para evitar estrés durante su cultivo. Por ejemplo, los cultivos de *Saccharum officinarum* (caña de azúcar) requieren un pH menor, debido a que de forma natural crecen en ambientes más ácidos (Cortes *et.al.*, 2017).

### **2.3.3.6 Medios de cultivo**

El éxito en la tecnología y la aplicación del cultivo de tejidos vegetales está muy influenciado por la naturaleza del medio de cultivo utilizado. Una mejor comprensión de los requisitos nutricionales de las células y tejidos cultivados puede ayudar a elegir el medio de cultivo más apropiado para el explante utilizado (Vargas y Flota, 2006).

Los medios de cultivo más utilizados se basan en las formulaciones establecidas definidas por Gamborg, Heller, Linsmaier y Skoog, Murashige y Skoog, Schenk y Hildebrandt, y White (Pollard y Walker, 1990). La diferencia más importante entre los medios puede ser el nivel general de sal. Parece haber básicamente tres tipos de medios diferentes según esta clasificación: medios con alto contenido de sal (por ejemplo, Medio Murashige y Skoog) (Tabla 11), nivel intermedio (por ejemplo, Nitsch y Nitsch (Tabla 12) y medios con bajo contenido de sal (por ejemplo, White) (Tabla 13) (Vargas y Flota, 2006).

**Tabla 11. Composición del medio Murashige y Skoog (Vargas y Flota, 2006)**

<b>Macroelementos</b>	<b>mg/L</b>	<b>mM</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20.6
KNO <sub>3</sub>	1900	18.8
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	3
MgSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	370	1.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1.25
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	0.1
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	0.1
<b>Microelementos</b>	<b>mg/L</b>	<b>µM</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	100
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3	100
ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	8.6	30
KI	0.83	5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	1
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.1
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.1
<b>Componentes orgánicos</b>	<b>mg/L</b>	<b>µM</b>
Myo-Inositol	100	555.1
Acido nicótico	0.5	4.06
Pyridoxina·HCl	0.5	2.43
Tiamina ·HCl	0.1	0.3
Glicina	2.0	26.6
Sacarosa	30,000	87.64
		(mM)
pH	5.7-5.8	

**Tabla 12. Composición del medio Nitsch y Nitsch (Vargas y Flota, 2006)**

<b>Macroelementos</b>	<b>mg/L</b>	<b>mM</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	720	9.0
KNO <sub>3</sub>	950	9.4
CaCl <sub>2</sub>	166	1.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	185	0.75
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	0.5
Na <sub>2</sub> EDTA	37.2	0.1
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	0.1
<b>Microelementos</b>	<b>mg/L</b>	<b>μM</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10	161.7
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	25	112.1
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10	42.8
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	1.0
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.1
<b>Compuestos orgánicos</b>	<b>mg/L</b>	<b>μM</b>
Myo-Inositol	100.0	555.10
Acido nicótico	5	40.6
Pyridoxina·HCl	0.5	2.43
Tiamina ·HCl	0.5	1.50
Glicina	2.0	26.60
Ácido fólico	0.5	1.1
Biotina	0.5	0.2
Sacarosa	20,000	58.42(mM)
pH	5.5	

**Tabla 13. Composición del medio White (Vargas y Flota, 2006)**

<b>Macroelementos</b>	<b>mg/L</b>	<b>mM</b>
KNO <sub>3</sub>	80	0.79
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	300	1.27
KCl	65	0.87
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	3.00
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	720	2.92
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	19	0.13
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200	1.40
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	2.5	0.006
<b>Microelementos</b>	<b>mg/L</b>	<b>µM</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.5	24.2
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	7.0	31.3
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.0	10.4
KI	0.75	4.5
MoO <sub>3</sub>	0.0001	0.007
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.001	0.004
<b>Compuestos orgánicos</b>	<b>mg/L</b>	<b>µM</b>
Acido nicótico	0.5	4.0
Pyridoxina·HCl	0.1	0.5
Tiamina ·HCl	0.1	0.3
Glicina	3.0	40.0
Sacarosa	20,000	58.42
pH	5.5	

### 2.3.3.6.1 Composición de los medios de cultivo

Los medios de cultivo están conformados por: sustancias minerales (macro y micronutrientes), vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento. Estos medios pueden ser líquidos o tener un soporte sólido (George, 1993).

#### 2.3.3.6.1.1 Sales minerales

**Macronutrientes.** Los macronutrientes se requieren en cantidades milimolares (mM). Calcio (Ca<sup>2+</sup>), potasio (K<sup>+</sup>), magnesio (Mg<sup>2+</sup>), nitrógeno (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), azufre (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) y fósforo (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) son los macroelementos e ingredientes esenciales de los medios de cultivo de tejidos vegetales. Estos se añaden al medio como nitrato de calcio,

dihidrogenofosfato de potasio y sulfato de magnesio. Alternativamente, el potasio y el calcio se pueden proporcionar como KCl o  $\text{KNO}_3$  y  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , respectivamente. El nitrógeno es uno de los elementos vitales necesarios para el crecimiento de las plantas tanto en los cultivos como en la naturaleza. El nitrógeno inorgánico generalmente se suministra en forma de iones de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y/o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). A veces, también se incluye en el medio una forma orgánica de nitrógeno, como urea, aminoácidos (glutamina) y/o hidrolizado de caseína (una mezcla compleja de aminoácidos y amonio) (Kumar & Saran, 2013).

**Micronutrientes.** Algunos micronutrientes, aunque necesarios en pequeñas cantidades, son esenciales para el crecimiento de tejidos en cultivos. Actúan como cofactores de enzimas. Los micronutrientes típicamente incluyen boro ( $\text{BO}_3^{3-}$ ; de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), manganeso ( $\text{Mn}^{2+}$ ; de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ; de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ; de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ; de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), molibdeno (generalmente como  $\text{MoO}_4^-$ ; de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ; de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). Algunas recetas de medios también incluyen cantidades muy pequeñas de yodo ( $\text{I}^-$ ; de KI). Para asegurar la disponibilidad de hierro en un rango de pH más amplio, se usa su forma quelada (Fe-EDTA) o se agrega un agente quelante como  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  en concentraciones equimolares junto con la sal de hierro ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Kumar & Saran, 2013).

#### 2.3.3.6.1.2 Reguladores de crecimiento

Los reguladores del crecimiento de las plantas incluyen tanto las hormonas vegetales naturales (fitohormonas) como los compuestos sintéticos, la mayoría de los cuales son análogos estructurales de las hormonas naturales y se unen a los mismos receptores (Baltz *et al.*, 2010). Una fitohormona es un compuesto producido internamente por una planta, que ejerce su función en muy bajas concentraciones y cuyo principal efecto se produce a nivel celular, cambiando los patrones de crecimiento de los vegetales y permitiendo su control. Los reguladores vegetales son compuestos sintetizados químicamente u obtenidos de otros organismos y son, en general, mucho más potentes que los análogos naturales. Es necesario tener en



cuenta aspectos críticos como oportunidad de aplicación, dosis, sensibilidad de la variedad, condición de la planta, etc., ya que cada planta requerirá de unas condiciones específicas de crecimiento que pueden afectarse por la concentración de ellos en el medio.

Los reguladores vegetales son productos sintéticos que se han convertido en las primeras herramientas capaces de controlar el crecimiento y actividad bioquímica de las plantas por lo que su uso ha aumentado en los últimos años. Existen distintos tipos de reguladores capaces de promover o inhibir el crecimiento vegetal (Alcantara *et al.*, 2019).

Los RCV se clasifican en auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico, ácido salicílico, poliaminas, jasmonatos y derivados, según su estructura molecular, su actividad a nivel vegetal, sus efectos inhibitorios o estimulantes, entre otras clasificaciones (Alcantara *et al.*, 2019), en la Tabla 14 se mencionan algunos de los reguladores mas empleados a nivel biotecnológico:

**Tabla 14. Reguladores de crecimiento de uso común y sus abreviaturas (Baltz *et al.*, 2010).**

Clase de Reguladores	Abreviatura o nombre común	Nombre químico
<b>Auxinas</b>	AIA	Ácido 3-indolacético
	ANA	Ácido Naftalenoacético
	AIB	Ácido Indolbutírico
	ApCFA	Ácido (4-clorofenoxi) acético
	2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
	Picloram	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropico-línico
	ANOA	Ácido naftoxiacético

<b>Citoquininas</b>	Kinetina (KIN)	6-furfurilaminopurina
	BAP (BA)	6-benzilaminopurina, 6-benziladenina
	2ip	Isopentiladenina
	Zeatina (ZEA)	N-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enil) aminopurina
	PBA	(6-benzilamino)-9-2-tetrahidropirani-9H-purina
	Tidiazurón (TDZ)	1-fenil-3(1,2,3-tidiazol-5il)urea
<b>Giberelinas</b>	Ac. Giberélico (GA3)	2,4a,7-trihidroxi-1-metil-8-metilen-gib-3-ene1,10-ácido carboxílico-1,4-lactona
<b>Inhibidores</b>	ABA	Ácido abscísico
<b>Etileno</b>	Etileno	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>
	Etefón	Ácido 2-cloroetilfosfónico

### Auxinas y citoquininas

Además de controlar los procesos fundamentales de crecimiento y desarrollo en las plantas, también se sabe que los RCV regulan la producción de metabolitos secundarios de las plantas en el cultivo de tejidos vegetales (Amoo & Staden, 2013).

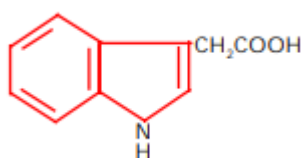
El equilibrio de los reguladores del crecimiento de las plantas (RCV), especialmente las auxinas y las citoquininas, tiene un efecto importante en la inducción y proliferación continua de callos, así como en la producción de metabolitos a partir de estos. Es posible aumentar el contenido de metabolitos secundarios bioactivos en el callo mediante distintas combinaciones y concentraciones de auxinas y citoquininas. Para esto último se utiliza principalmente un tipo específico y una concentración relativamente alta de auxina según la especie vegetal (Park *et al.*, 2020).

## Auxinas

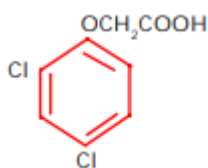
Las auxinas se utilizan mucho en el cultivo de tejidos vegetales y suelen formar parte integral de los medios nutritivos. Las auxinas promueven, principalmente en combinación con citoquininas, el crecimiento de callos, suspensiones celulares y órganos, y también regulan la dirección de la morfogénesis. La palabra auxina tiene un origen griego: auxein significa agrandar o crecer. A nivel celular, las auxinas controlan procesos básicos como la división y el alargamiento celular. Dado que son capaces de iniciar la división celular, participan en la formación de meristemas que dan lugar a tejido desorganizado u órganos definidos (George *et al.*, 2008).

Por lo general, se requiere una auxina para la inducción de callos a partir de explantes. Las auxinas aplicadas parecen ser capaces de alterar fundamentalmente la fisiología programada genéticamente de tejidos vegetales completos, que previamente habían determinado su estado diferenciado. Las células, que responden a la auxina, vuelven a un estado desdiferenciado y comienzan a dividirse (George *et al.*, 2008).

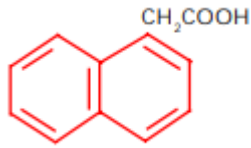
La auxina empleada con más frecuencia para iniciar cultivos de callos es 2,4-D. Sin embargo, dado que los cultivos mantenidos en 2,4-D pueden volverse genéticamente variables, algunos investigadores prefieren ANA o AIA, o una transferencia de callo a un medio que contenga uno de estos compuestos alternativos una vez que ha sido iniciado por 2,4-D (Figura 8) (George *et al.*, 2008).



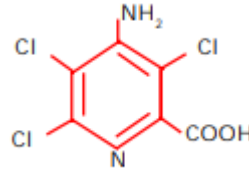
AIA (Ácido 3-indolacético)



2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético)



ANA (Ácido Naftalenoacético)



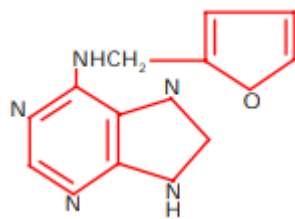
Picloram (Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico)

**Figura 8. Estructuras de las auxinas AIA, 2,4-D, ANA y picloram**

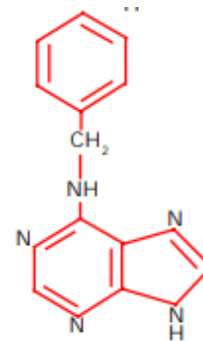
### Citoquininas

Las citoquininas tienen la capacidad de estimular e inducir una alta proliferación y división celular (Figura 9). El efecto de las citoquininas es más notable en cultivos de tejidos donde se utilizan, a menudo junto con auxinas, para estimular la división celular y controlar la morfogénesis (George *et al.*, 2008).

Su efecto en el sistema vegetal casi siempre suele acompañarse de la presencia de auxinas debido a su alta complementariedad en la estimulación del crecimiento y desarrollo vegetal, por lo que una concentración similar de la relación auxinas-citoquininas puede inducir la proliferación de células no diferenciadas (meristemos o callos vegetales), mientras que una mayor concentración de auxinas podría generar un incremento en la producción de raíces, una concentración mayor de citoquininas puede inducir una mayor producción de brotes vegetales, lo cual puede sugerir que una concentración ideal de ambas fitohormonas en un medio de cultivo estable o en un sustrato adecuado podrían mejorar y acelerar el crecimiento vegetal (George *et al.*, 2008).



KIN (6-furfurilaminopurina)



BAP (6-benzilaminopurina)

**Figura 9. Estructuras de las citoquininas KIN y BAP**

#### **2.3.3.6.1.3 Agentes quelatos**

Son necesarios para la síntesis de la clorofila y en muchas funciones de oxidación y reducción, pues son compuestos cuyas moléculas son capaces de adsorber un ión de un metal. Existen varios agentes quelantes, pero el más usado es el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) por ser menos tóxico que otros quelatos y, que en combinación con  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en bajas concentraciones, estimula el crecimiento permitiendo la disponibilidad de hierro al cultivo (Aguirre *et al.*, 2016).

#### **2.3.3.6.1.4 Carbohidratos**

Es indispensable añadir una fuente de carbono al medio de cultivo, como fuente de energía y regulador osmótico. La sacarosa es la fuente de energía más utilizada en cultivo *in vitro*, pero en ocasiones se emplean otros carbohidratos como la glucosa, fructuosa, galactosa y maltosa, pero estos compuestos son inferiores a la sacarosa, que puede ser sustituida por azúcar comercial, llegándose a obtener óptimos resultados. Regularmente las concentraciones óptimas son de 2 a 3%, sin embargo, en ciertas especies se utilizan concentraciones muy elevadas de 5 a 12%. (Aguirre *et al.*, 2016).

#### **2.3.3.6.1.5 Vitaminas**

Las vitaminas tienen funciones catalíticas en las reacciones enzimáticas. La vitamina considerada importante para las células vegetales es la tiamina (B1). Otras vitaminas, ácido nicotínico (B3) y piridoxina (B6), se agregan a los medios de cultivo celular, ya que pueden mejorar la respuesta celular (Smith, 2012).

#### **2.3.3.6.1.6 Aminoácidos**

Los aminoácidos representan, para las células, una fuente efectiva e inmediata de nitrógeno, puesto que se pueden incorporar al metabolismo mucho más rápido que el nitrógeno inorgánico, aun cuando ambas fuentes se encuentran en el mismo

medio. Es conocido que su empleo está en función del balance adecuado de la relación  $\text{NH}_4/\text{NO}_3$  que es usualmente suministrado como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , etc. Generalmente la inclusión de estos compuestos nitrogenados orgánicos es necesaria solamente cuando se inicia la formación de callo, ya que se consideran estimulantes de la proliferación celular (Sharry *et al.*, 2015).

La glicina, el aminoácido más simple, es un componente común de los medios de cultivo de tejidos vegetales. Otros incluyen L-glutamina, asparagina, serina y prolina (Saran & Kumar, 2013).

#### **2.3.3.6.1.7 Agente gelificante**

El agente gelificante es un carbohidrato (hetero-polisacárido) cuya concentración puede variar entre 50 a 90%. Estos agentes son necesarios para dar consistencia al medio nutritivo (en el caso de medios semisólidos), de modo que el explante quede en la superficie (Prieto *et al.*, 2005; Levitus *et al.*, 2010).

Phytigel® es producido en laboratorio y se caracteriza por ser uno de los gelificantes con menor porcentaje de impurezas, de textura fina y de calidad más consistente que la mayoría de los agares, facilita la detección de cualquier agente contaminante por su apariencia cristalina (Villegas, 1988). Sigma-Aldrich (2003-2004) señala que el phytigel es un agente gelificante de alta fuerza, de textura fina descolorida (Pérez & Claire, 2004; Aguirre *et al.*, 2016) y es empleado en una proporción de 0.25% a 0.4% (Prieto *et al.*, 2005).

#### **2.3.3.6.1.8 Agua**

En la micropropagación comercial, rutinariamente se usa agua destilada común, pero para los estudios de investigación se requiere formas más puras: desionizada, bidestilada. Normalmente, se recomienda que el agua sea desionizada, además de estar destilada en condensador de vidrio (Aguirre *et al.*, 2016).

### 3. JUSTIFICACIÓN

*C. filaginoides* es una planta medicinal mexicana la cual en los últimos años ha sido ampliamente comercializada como remedio natural a nivel local, sin embargo, lo anterior ha derivado en una sobreexplotación de la especie limitando significativamente su distribución y propagación geográfica, y colocándola como una especie en riesgo de peligro de extinción, por tal motivo es necesario buscar nuevas alternativas que permitan satisfacer la demanda comercial de la misma con el objetivo de cuidar al mismo tiempo su preservación nativa. Una excelente opción para obtener una amplia disponibilidad de la planta es la técnica de cultivo *in vitro*, además de que a condiciones controladas aplicadas mediante tal técnica se pueden obtener compuestos bioactivos (metabolitos secundarios) de interés al igual que en la planta silvestre e incluso la posibilidad de un aumento de tales compuestos los cuales pueden ser utilizados para complementar los tratamientos tradicionales y como una alternativa para la producción de fármacos naturales para el atendimento de diversas enfermedades.

#### **4.HIPÓTESIS**

Células de cultivo *in vitro* de callos de hoja y pecíolo de *C. filaginoides* permitirán la producción de compuestos bioactivos identificados en la planta silvestre.

#### **5.OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo general**

Establecer cultivos de callo productores de compuestos bioactivos de la especie *C. filaginoides*

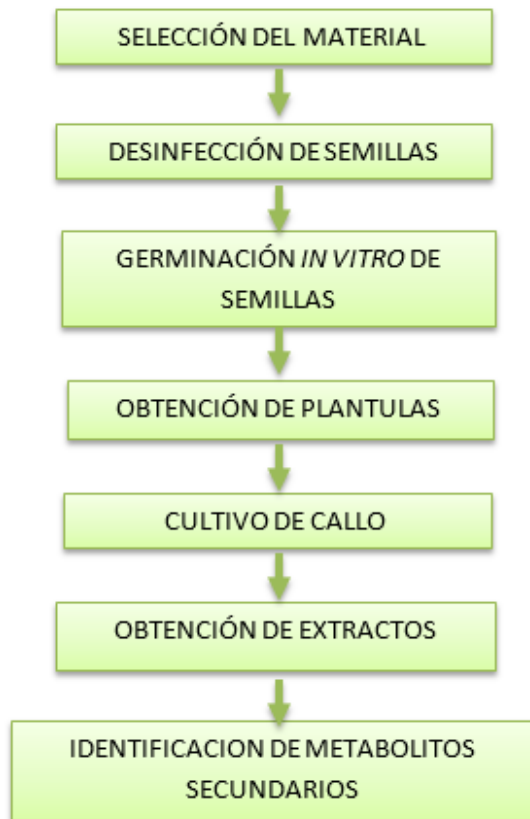
##### **5.1.1Objetivos específicos**

- Establecer las condiciones de desinfección y germinación *in vitro* de semillas de *C. filaginoides*
- Inducir la formación de callo en explantes de hoja y pecíolo de plántulas cultivadas bajo condiciones *in vitro* de *C. filaginoides*
- Obtener extractos orgánicos de biomasa de cultivos de callos de *C. filaginoides* y comparar rendimientos con respecto al de la planta silvestre
- Identificar el perfil fitoquímico de biomasa de los cultivos de callos mediante cromatografía en capa fina y comparar con respecto al de la planta silvestre
- Identificar la presencia de compuestos bioactivos de interés en cultivo de callos por medio de CG-MS y comparar con respecto a los producidos en la planta silvestre.



## 6. METODOLOGÍA

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. En la Figura 10 se describe de manera general el desarrollo experimental de la investigación.



**Figura 10. Esquema general del desarrollo experimental de la presente investigación.**

## **6.1 Establecimiento del cultivo aséptico de plántulas de *C. filaginoides***

### **6.1.1 Material vegetal**

Para el establecimiento de cultivo *in vitro* de plántulas se recolectaron ejemplares de la especie en la región de Acaxochitlán ubicada en el estado Hidalgo, México con las siguientes coordenadas (20°11'55"N, 98° 15'33"O), la recolección fue realizada a mediados de octubre del año 2019, siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, (2003), la cual especifica que el mejor momento para cosechar (la temporada y horas del día óptimos) debe determinarse en función de la calidad y la cantidad de los componentes con actividad biológica. De acuerdo a la literatura se determinó que el periodo de septiembre a noviembre era apto para la recolección de la especie, ya que estudios fitoquímicos realizados con ejemplares de la planta recolectada entre ese periodo revelaron la identificación y aislamiento de compuestos bioactivos con actividades farmacológicas importantes, entre ellos se encuentran compuestos con actividad antinociceptiva e hipoglucémica (rutina) (Ovalle *et al.*, 2015); y actividad relajante del músculo liso (flavonoides y terpenoide) (Mata *et al.*, 1997), identificados a partir de material vegetal recolectado en el mes de septiembre y octubre, respectivamente.

Un ejemplar de la especie fue llevado al Herbario de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa para su identificación, donde el Biólogo Jorge Santana Cerón determinó que el mismo pertenecía a la especie *Conyza filaginoides* (D.C.) Hieron de la familia Asteraceae. El ejemplar fue depositado en UAMIZ.

El material vegetal fue secado bajo sombra al aire libre.

### **6.1.2 Desinfección de semillas de la especie *C. filaginoides***

A partir del material vegetal seco se seleccionaron las semillas más grandes de color negro grisáceo y fueron colocadas en papel filtro y cuidadosamente selladas, lo anterior para facilitar su manejo, limpieza y desinfección. Debido a que la especie

en estudio no cuenta con un método de desinfección de semillas se probaron 3 tratamientos de desinfección los cuales se basan en el empleo de diferentes agentes desinfectantes que han resultado ser efectivos para la desinfección de semillas de otras especies (Tabla 15).

**Tabla 15. Tratamientos de desinfección empleados para semillas de *C. filaginoides***

Pasos del procedimiento	Tratamiento A	Tratamiento B	Tratamiento C
<b>Paso 1</b>	Sumergir en 100 mL de H <sub>2</sub> O destilada estéril con 2 gotas de detergente liquido Axion® por 10 min	Sumergir en 100 mL de H <sub>2</sub> O destilada estéril con 2 gotas de detergente liquido Axion® por 10 min	Sumergir en 100 mL de H <sub>2</sub> O destilada estéril con 2 gotas de detergente liquido Axion® por 10 min
<b>Paso 2</b>	Colocar en sol. Hipoclorito de sodio ( Cloralex®) al 10% en H <sub>2</sub> O destilada estéril por 15 min	Colocar en sol. Hipoclorito de sodio ( Cloralex®) al 10% en H <sub>2</sub> O destilada estéril con 0.2% de Tween 80 por 15 min	Colocar en sol. Hipoclorito de sodio ( Cloralex®) al 10% en H <sub>2</sub> O destilada estéril por 15 min
<b>Paso 3</b>	Sumergir en alcohol etílico al 70% v/v en H <sub>2</sub> O destilada estéril por 30 s.	Sumergir en alcohol etílico al 70% v/v en H <sub>2</sub> O destilada estéril por 30 s.	*Sumergir en peróxido de hidrogeno al 4% v/v en H <sub>2</sub> O destilada estéril por 10 min.
<b>Paso 4</b>	3 lavados con H <sub>2</sub> O destilada estéril de 5 min cada uno	3 lavados con H <sub>2</sub> O destilada estéril de 5 min cada uno	3 lavados con H <sub>2</sub> O destilada estéril de 5 min cada uno
<b>Referencia</b>	Pola <i>et al.</i> , 2019 y Sánchez <i>et al.</i> , 2019 con algunas modificaciones(conc entración y tiempo de inmersión en Hipoclorito de sodio)	Salazar, 2012 con algunas modificaciones (concentración y tiempo de inmersión en Hipoclorito de sodio con Tween)	Flores <i>et al.</i> , 2008 y Marcu <i>et al.</i> , 2014 con algunas modificaciones (tiempo de inmersión en peróxido de hidrogeno)

\* Nota: El peróxido de hidrogeno(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en concentraciones mayores al 10% produce daños a los tejidos (ATSDR, 2002).

El proceso de desinfección de semillas fue realizado en la campana de flujo laminar VECO, con agitación constante de las semillas en cada uno de los pasos.

### **6.1.3 Cultivo *in vitro* de semillas de *C. filaginoides* en medio aséptico**

Las semillas desinfectadas por diferentes métodos como se especifica en el punto 6.1.2 se cultivaron en tubos de ensaye con 15 mL de medio Murashige & Skoog al 100% adicionado con 30 g/L de sacarosa, 2 g/L de agente gelificante, con pH ajustado de 5.6-5.8, lo anterior sin el empleo de reguladores de crecimiento, colocando tres semillas por cada tubo de siembra con 6 repeticiones y realizándose en campana de flujo laminar VECO. El medio Murashige & Skoog fue previamente esterilizado en autoclave a 121 °C por 15 min. Posteriormente las semillas se llevaron a incubación a  $25 \pm 2$  °C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

### **6.1.4 Determinación del % de desinfección de semillas y % de germinación**

Una vez observada respuesta de germinación en las semillas sembradas bajo condiciones controladas de luz y temperatura (punto 6.1.3) se evaluó el porcentaje de semillas con germinación y libres de contaminación. Las plántulas obtenidas se cultivaron en frascos tipo gerber con 45 mL de medio de cultivo MS (Murashige & Skoog) preparado como en el punto 6.1.3 y se llevaron a incubación bajo las mismas condiciones especificadas con subcultivos cada 15 días durante aproximadamente 2 meses.

## **6.2 Establecimiento de cultivo de callos**

A partir de plántulas 2 meses de edad de *C. filaginoides* obtenidas como lo especifica el punto 6.1.4., se extrajeron explantes de hojas y pecíolos de 1X1 cm aprox. con ayuda de bisturí dentro de una caja Petri con solución antioxidante (100 mg/L de ácido cítrico y 150 mg/L de ácido ascórbico). Posteriormente se sembraron, colocando 1 explante en 3 o 4 tubos de ensaye con 15 mL de medio Murashige & Skoog semisólido preparado y esterilizado como se especifica 6.1.2 con la combinación de reguladores de crecimiento (RCV) correspondiente a cada tratamiento (Tabla 16), llevando a incubación a  $25 \pm 2$  °C con un fotoperiodo de 16

h luz y 8h oscuridad, realizando subcultivos a medio fresco aproximadamente cada 4 semanas.

**Tabla 16. Combinaciones de RCV's (tratamientos) para la inducción a callogénesis en la especie *C. filaginoides***

Tratamiento	Citoquininas (mg/L)		Auxinas (mg/L)			
	KIN	BAP	ANA	2,4-D	Picloram	AIA
Control	0	0	0	0	0	0
T1	0.1		0.1			
T2	0.1		1			
T3	0.1			0.1		
T4	0.1			1		
T5	0.1				0.1	
T6	0.1				1	
T7	0.1					0.1
T8	0.1					1
T9		0.1	0.1			
T10		0.1	1			
T11		0.1		0.1		
T12		0.1		1		
T13		0.1			0.1	
T14		0.1			1	
T15		0.1				0.1
T16		0.1				1

RCV's: ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram) y ácido indolacético (AIA) y 6-furfurilaminopurina (KIN), 6-benzilaminopurina (BAP).

### 6.3 Extracción e identificación de compuestos fitoquímicos en biomasa de cultivo de callo de *C. filaginoides*

#### 6.3.1. Obtención de extractos de biomasa de cultivos de células de callo de *C. filaginoides*

Se pesó 1 g de biomasa fresca de callo de 2 meses de edad de cada tratamiento, posteriormente se secó en estufa a 60 °C por 8 h y se trituró hasta pulverización. Después se obtuvo el extracto de la biomasa seca y pulverizada con 30 mL de una solución de diclorometano-metanol (1:1) y se sonó durante 20 min. La biomasa se filtró al vacío con embudo Büchner, y el disolvente se concentró en un evaporador

rotatorio hasta sequedad (realizando por triplicado). El extracto obtenido fue depositado en un vial previamente pesado e identificado. Finalmente se realizo el calculo del rendimiento (%) de los extractos organicos.

### **6.3.2. Obtención de extractos de las partes aéreas de *C. filaginoides***

Se pesaron 108.11 g de las partes aéreas de la planta y se trituraron hasta pulverización. Después se obtuvo el extracto de la biomasa seca y pulverizada en 300 mL de una solución de diclorometano-metanol (1:1) y se sónico durante 20 min. La biomasa se filtró al vacío con embudo Büchner, y el disolvente se concentró en un evaporador rotatorio hasta sequedad (realizando por triplicado). El extracto obtenido fue depositado en un vial previamente pesado e identificado. Finalmente se realizo el calculo del rendimiento (%) del extracto orgánico.

### **6.3.3. Identificación cualitativa de presencia de compuestos en los diferentes tratamientos de callo de explante de hoja y pecíolo de *C. filaginoides* por cromatografía en capa fina**

Los extractos se analizaron de manera cualitativa mediante cromatografía en capa fina fase normal, utilizando cromatoplasas de sílica gel 60 Merck (F254, 0.2 mm) y como sistema de elusión en un sistema de elusión de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (95:05); las placas fueron reveladas bajo luz ultravioleta (onda corta) y posteriormente con sulfato cérico amoniacal al 1% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (revelador universal). Se utilizaron estándares conocidos de quercetina y rutina (Sigma-Aldrich, ciudad y país de adquisición) para comparar los perfiles cromatográficos de cultivo de callo y planta silvestre.

### **6.3.4 Identificación de compuestos por cromatografia de gases acoplada a espectrometría de masas**

De cada extracto obtenido como lo indica el punto 6.3.1 se pesaron 2mg y resuspendieron en 0.5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se llevaron a su análisis en un cromatógrafo

de gases HP Agilent Technologies 6890 equipado con un detector de masas cuadrupolo MSD 5973 (HP Agilent) equipado con:

- Columna capilar HP-5MS (longitud: 30 m; diámetro interior: 0.25 mm; espesor de película: 0.25  $\mu\text{m}$ ).
- Gas acarreador: helio (1 mL por minuto).
- Condiciones: temperatura de entrada se fijó a 250 °C y la del horno inicialmente fue de 40 °C (se mantuvo durante un minuto) y aumentó a 280 °C a una velocidad de 10 °C por minuto.
- El espectrómetro de masas se hizo funcionar en electrones positivos en modo de impacto con energía de ionización de 70 eV. La detección se realizó en monitorización selectiva de iones.

#### **6.4 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de porcentaje de desinfección de semillas fueron analizados mediante un ANOVA one way, prueba Tukey con  $\alpha = 0.05$  (n=6).

Es importante mencionar que debido al acortado tiempo de experimentación y la falta de disponibilidad de material vegetal no se pudieron realizar suficientes repeticiones de inducción a cultivo de callo lo cual impidió llevar a cabo un análisis estadístico reforzado para tal etapa.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Establecimiento de un método de micropropagación de *C. filaginoides*

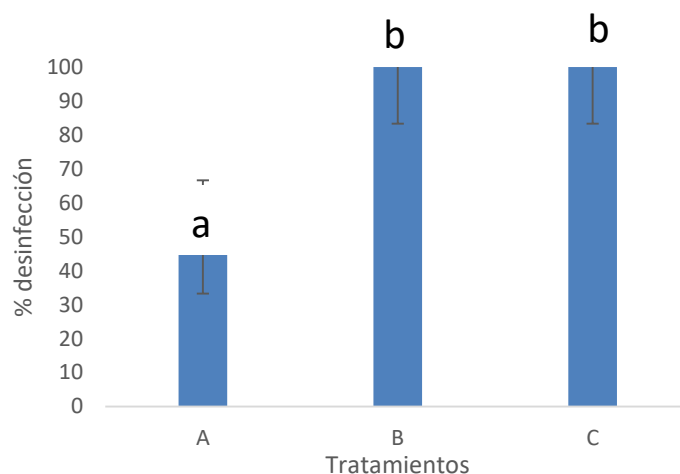
Con la finalidad de obtener material vegetal disponible para el presente estudio se llevó el establecimiento de un método de micropropagación de la especie, mediante la técnica de cultivo *in vitro*. Es importante mencionar que *C. filaginoides* cuenta con numerosos estudios fitoquímicos que respaldan sus usos etnomédicos, sin embargo, no se han reportado estudios biotecnológicos que empleen la técnica de cultivo *in vitro* en la especie, el presente estudio inició con la germinación de semillas bajo condiciones *in vitro*, para ello, se colectaron semillas en su hábitat natural y se encontró que crecen con abundantes microorganismos e insectos, esto complicó su cultivo bajo condiciones *in vitro* y llevó a buscar un método de desinfección adecuado que permitiera de manera paralela obtener un porcentaje alto de germinación. Para lo anterior se seleccionaron las semillas más grandes de color negro grisáceo (Figura 11).



Figura 11. Semillas seleccionadas de *C. filaginoides*



### 7.1.1 Desinfección de semillas de la especie *C. filaginoides*



**Figura 12. % de desinfección de semillas de *C. filaginoides* obtenido de diferentes tratamientos aplicados. Letras distintas indican diferencias significativas a un nivel de confianza de 95%.**

Con un 95% de confiabilidad se observa que los tratamientos más efectivos son el B y C, ya que permiten obtener un 100% de desinfección, mientras que el tratamiento A proporciona el porcentaje más bajo de desinfección (50%) (Figura 12).

El tratamiento A en el que se emplea 10% de hipoclorito de sodio (NaOCl) v/v y 70% v/v etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) como agentes desinfectantes, es uno de los métodos más usados y eficaz para la desinfección de semillas de diferentes especies incluyendo a las pertenecientes a la familia Asteraceae. Elaleem *et al.*, (2015) y Sánchez, (2019) obtuvieron un 100% de desinfección en semillas de las especies *Helianthus annuus* L. y *A. pichinchensis* sin embargo, el empleo de ambos desinfectantes permitió obtener solo un 50% de desinfección en semillas (presentando contaminación fúngica) de la especie en estudio, lo cual permite discernir que la eficacia de tales desinfectantes por sí solos puede variar dependiendo de la especificidad de los mismos y la carga microbiana nativa que contengan las semillas de una especie en particular.

Estadísticamente los tratamientos B y C no fueron distintos entre sí, ya que ambos permiten obtener un 100% de desinfección en semillas de la especie en estudio, de acuerdo a lo anterior se considera que el empleo de 0.2% de Tween 80 y 4% de

peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) tienen la misma eficacia de desinfección en semillas de la especie *C. filaginoides* proporcionando un efecto coadyuvante con cloro 10% v/v y etanol al 70% v/v.

Reportes de especies de la familia Asteraceae permiten corroborar la efectividad de desinfección de los agentes NaOCl, etanol 70% y Tween 80 (como agente tensioactivo no iónico), mismos que fueron empleados exitosamente para la desinfección de semillas de la especie en estudio. Durosomo *et al.*, (2014) empleo de hipoclorito de sodio 10%, etanol 70% y Tween 20 en la desinfección en semillas de *Solanum lycopersicum* obteniendo un 100% de desinfección, mientras que el empleo de etanol 70% durante 30 s e hipoclorito de sodio al 1.0% con dos gotas de Tween-20®, es un protocolo establecido para la desinfección de semillas de *Cattleya mendelii* Dombrain (Salazar, 2012).

La efectividad del tratamiento B está basada principalmente en el empleo de Tween 80, siendo notorio tal efecto ya que la única diferencia entre el tratamiento A y B, es que en este último se suministró 0.2% de Tween 80. Este agente es empleado como humectante o surfactante, que rompe la tensión superficial y permite que los agentes desinfectantes (en este caso etanol y cloro) tengan mayor contacto con la superficie de la semilla (Cruz, 2012; Roca *et al.*, 1993), lo cual permitió una mayor desinfección.

La efectividad del tratamiento C se atribuye a la propiedad del  $H_2O_2$  para disminuir la dureza de la testa (escarificación), lo cual favoreció la absorción del hipoclorito de sodio y  $H_2O_2$  en las semillas de *C. filaginoides*, permitiendo un mayor contacto y por ende una mayor desinfección de las mismas (Duarte *et al.*, 2014), lo que permite confirmar que la combinación de ambos proporciona un efecto coadyuvante en la desinfección de semillas de *C. filaginoides*, cabe resaltar que la contaminación presentada en las semillas fue de tipo fúngico. El  $H_2O_2$  se ha utilizado durante años para desinfectar semillas antes de su cultivo (Yildiz & Er, 2002), y es conocido por presentar un efecto bactericida, viricida y fungicida (Pernezny *et al.*, 2002; Flores, 2008), mientras que el cloro y etanol son eficaces en la mayoría de las bacterias patógenas, pero de acción imprevisible contra hongos y virus, lo cual permite

confirmar la efectividad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para atender la contaminación por hongos en las semillas de la especie en estudio, por otra parte, la acción desinfectante del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se centra en su capacidad de actuar como un agente oxidante energético, para el caso de la desinfección de la semilla, las bacterias que existen en ella no presentan enzimas como la catalasa o peroxidasa capaces de degradar el peróxido de hidrógeno como agua y oxígeno, y por lo tanto, no pueden eliminar los productos nocivos resultantes del oxígeno, lo cual conlleva a su erradicación (Lañes, 1998; Flores, 2008).

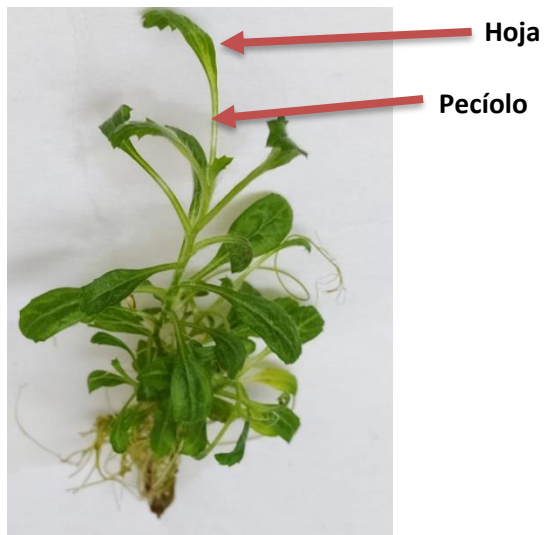
Diversos estudios corroboran la efectividad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente desinfectante, Duarte *et al.*, (2014) reporta que la combinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NaOCl permite obtener una óptima desinfección en semillas de *Amblycerus longesuturalis*, mientras que el empleo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en la especie *Nolina parviflora* proporciono buenos resultados de desinfestación (Flores *et al.*, 2008). Marcu *et al.*, (2014) describe el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como un buen agente de esterilización que rompe el letargo de la semilla, comprobando al mismo tiempo la eficacia de tal agente obteniendo una tasa de contaminación muy baja de apenas 1.8% en semillas de *Achillea pyrenaica*.

### 7.1.2 Germinación de semillas de la especie *C. filaginoides*

La germinación de las semillas desinfestadas y cultivadas en medio Murashige & Skoog se observó en el día 15 posterior a su siembra (Figura 13), las plántulas obtenidas de los 3 tratamientos de desinfección probados, presentaron un sano desarrollo y fueron subcultivadas durante 2 meses aproximadamente (Figura 14).

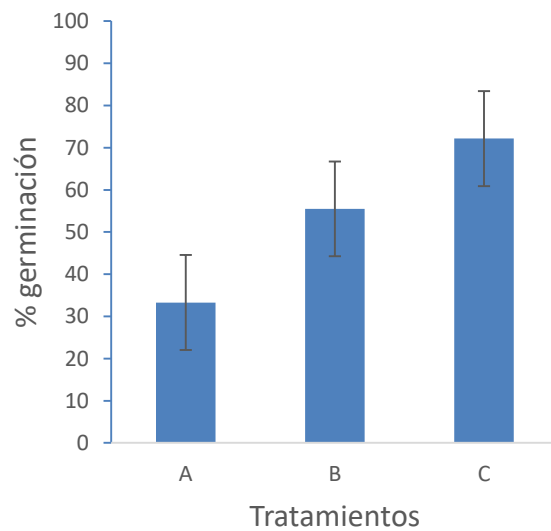


**Figura 13. Germinación de semillas de *C. filaginoides* en el día 15 de cultivo obtenidas mediante el tratamiento C**



**Figura 14. Plántula de 2 meses de edad *C. filaginoides***

El tratamiento C permitió obtener un 72.18% de germinación, seguido del tratamiento B con un 55.5% y el tratamiento A con el porcentaje más bajo de 33.3% (Figura 15).



**Figura 15. % de germinación de semillas de *C. filaginoides*, obtenido de diferentes tratamientos aplicados.**

Como se puede observar los tratamientos B y C permitieron un aumento considerable en el porcentaje de germinación de la especie en comparación con el tratamiento A.

Por medio del tratamiento A se obtuvieron resultados de germinación similares a lo reportado en otras especies de la misma familia como *Stevia rebaudiana*, *Gynoxys verrucosa*, *Achyrocline satureioides* y *Achillea pyrenaica*, en las cuales se han determinado bajas tasas de germinación que van del 20 al 45 % (Gattuso *et al.*, 2007; Marcu *et al.*, 2014; Halim *et al.* 2016; Cueva & Lucero, 2018), la variación en los porcentajes de respuesta de germinación puede deberse a diversos factores entre los que se encuentran principalmente la influencia genética de la familia, las condiciones de la semilla en su hábitat natural y el efecto de los agentes químicos empleados para desinfectar y escarificar la semilla. La familia Asteraceae presenta la característica de producir una gran cantidad de semillas con fines de lograr mayor supervivencia, pero no todas poseen reservas energéticas, lo que provoca su deterioro, por lo que su calidad se ve afectada por daños mecánicos, humedad de la semilla, patógenos y muchos otros factores que afectan su recuperación y por ende su respuesta germinativa (Cueva & Lucero, 2018).

Se han reportado diversos estudios que emplean métodos químicos para incrementar la respuesta germinativa de semillas de distintas especies; entre los agentes químicos usados para este fin, se encuentran el peróxido de hidrogeno y algunos RCV como la kinetina y ácido giberélico AG3 (Amador *et al.*, 2013) la efectividad de estos métodos está basada en la concentración y tiempo de empleo de los agentes químicos usados (Cueva & Lucero, 2018). En el presente estudio, el tratamiento de desinfección C que consiste en el empleo de NaOCl al 10% durante 15 min y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 4% por 10 min, proporciono un aumento del 38% de germinación con respecto al tratamiento A, tal aumento se atribuye a la propiedad escarificante del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que permite ablandar la testa de la semilla (Duarte *et al.*, (2014) aumentando la permeabilidad del agua y oxígeno en la misma (Barnett, 1998), lo que facilita a nivel celular la oxidación de grasas y su conversión a carbohidratos,

promoviendo la activación de enzimas y reacciones sintéticas esenciales para movilización de componentes celulares involucrados en el crecimiento de la raíz (Flores, 2008); y posiblemente la actividad oxidante del peróxido de hidrógeno suprime la actividad inhibitoria de la germinación en la cubierta de la semilla (Barampuram *et al.*, 2014). Estudios anteriores han demostrado que el empleo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mejora las tasas de germinación en semillas de pino y cártamo (Hoefnagels & Linderman 1999; Cram & Fraedrich 2009; Lizarraga *et al.*, 2013), así mismo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue utilizado en *Gynoxys verrucosa* y *Diospyros riojae* como promotor de la germinación, obteniendo resultados favorables en ambas especies (Sanchez *et al.*, 2002; Cueva & Lucero, 2018).

Por otra parte, el tratamiento B permitió un aumento del 22.2% en la germinación de semillas de *C. filaginoides*, como se mencionó anteriormente (apartado de contaminación) Tween 80 es conocido por romper la tensión superficial, lo cual aumenta la permeabilidad del oxígeno y agua en la semilla, por lo cual se puede pensar que produce un efecto similar al peróxido de hidrogeno.

Se establece que el mejor método para la micropropagación de la especie *C. filaginoides*, es el tratamiento C, el cual permite obtener un porcentaje considerable de germinación (72.18%) y cultivos libres de contaminación (con 100% de desinfección). Este tratamiento se basó en el empleo de NaOCl al 10% durante 15 min y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 4% por 10 min, dicha combinación de agentes permite obtener un 100% de desinfección y promueve un aumento en la germinación de semillas de *C. filaginoides*, cabe resaltar que es la primera investigación en la que se establece un método de micropropagación *in vitro* de la especie (*C. filaginoides*). Mismos resultados se han reportado para otras especies, Yanagawa *et al.*, (1995) obtuvieron cultivos estériles utilizando como desinfectantes cloro y peróxido de hidrógeno para la siembra y propagación de cultivos de plántulas de orquídeas, mientras que Duarte *et al.*, (2014) obtuvieron un 93,3±6,7% de germinación y una óptima desinfección en semillas de *Amblycerus longesuturalis*, al emplear la combinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y

NaOCl, logrando establecer dicha combinación como método para la propagación *in vitro* de la especie.

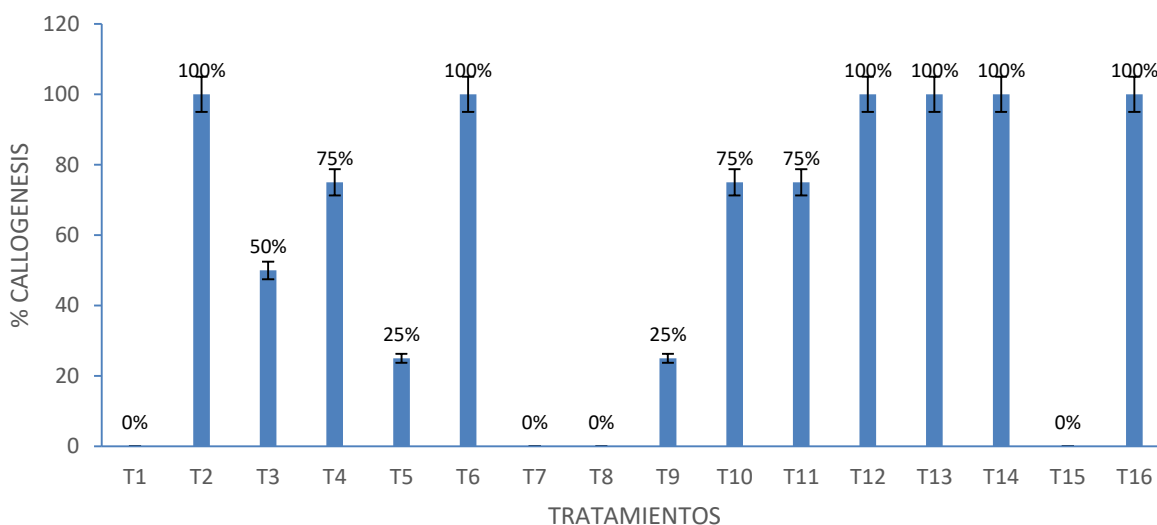
## **7.2 Inducción a callo de *C. filaginoides***

A continuación, se presentan resultados preliminares de inducción a callogénesis en la especie *C. filaginoides*, es importante mencionar que, debido al acortado tiempo de trabajo experimental, y la falta de material vegetal aunado al tiempo de espera para el desarrollo óptimo de las plántulas (2 meses de edad) imposibilitó obtener más repeticiones de cada uno de los tratamientos por lo cual no se presenta un análisis estadístico para este apartado.

Como el objetivo del presente trabajo fue establecer cultivos de callo productores de compuestos bioactivos de la especie *C. filaginoides*, y debido a que no se cuentan con estudios biotecnológicos similares en la especie, se decidió emplear un abanico amplio de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) que más popularmente se agregan a los medios de cultivo, de los cuales se ha comprobado su efectividad para producir callos friables y metabolitos secundarios de interés en diversas especies de planta incluyendo a las de la familia Astereaceae, como *Saussurea obvallata* (Dhar & Joshi, 2005), *Ageratina pichinchensis* (Sanchez *et al.*, 2018), *Stevia rebaudiana* (Gupta *et al.*, 2010), *Helianthus annuus* L (Pola *et al.*, 2019), *Ophiorrhiza mungos* L (Krishnan *et al.*, 2019), *Hylocereus costaricensis* (Winson *et al.*, 2020), *Sophora flavescens* (Park *et al.*, 2020), *Gynochthodes umbellata* (Anjusha & Gangaprasad, 2017) entre otras. Los RCV empleados fueron 2,4-D, ácido indol-3-acético (IAA), ácido 1-naftalenoacético (NAA) y picloram (auxinas), y BAP y KIN (citoquinas) (Kulus & Tymoszuk, 2020), ambos grupos de RCV (auxinas y citoquininas) fueron añadidos conjuntamente debido a su alta complementariedad para inducir la proliferación de células no diferenciadas (callos vegetales) (Alcantara *et al.*, 2019).

### 7.2.1 Respuestas de inducción a callogénesis en explante de hoja

En los resultados de esta sección se muestra que el 75% del total de los tratamientos probados proporcionaron respuesta de callo, porcentaje del cual 37.5% de los tratamientos dieron una respuesta de 100% de callogénesis, 18.75% una respuesta del 75%, 6.25% una respuesta del 50% y 12.5% una respuesta de 25%. El índice de los tratamientos sin respuesta fue del 25% (Figura 16).



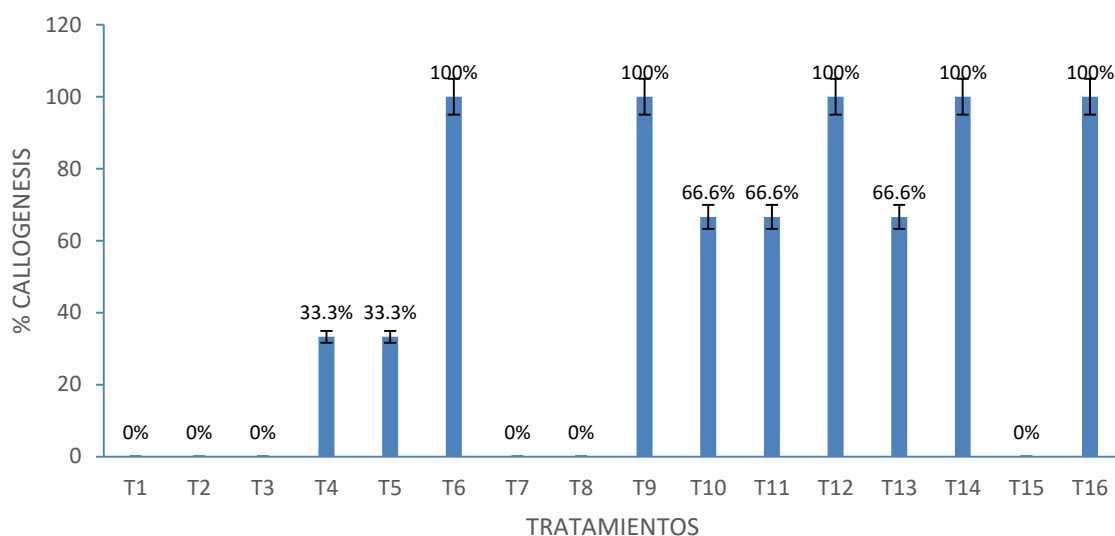
**Figura 16. % de callo obtenido en los diferentes tratamientos aplicados a explantes de hoja de *C. filaginoides*, n= 4**

Los tratamientos que promovieron una inducción del 100% fueron el 2, 6, 12, 13, 14 y 16 donde los tratamientos 6 (0.1 mg/L KIN + 1 mg/L PIC) y 14 (0.1 mg/L BAP + 1 mg/L PIC) proporcionaron las mejores características de callos (callos friables y sin oxidación) en comparación con los tratamientos restantes (Figuras 20 a y 20 c).

### 7.2.2. Respuestas de inducción a callogénesis en explante de pecíolo

En este apartado del experimento se observó que el 62.5% del total de los tratamientos probados proporcionaron respuesta de callo, porcentaje del cual 31.25% de los tratamientos dieron una respuesta de 100% de callogénesis 18.75 % una respuesta del 66.6% y 12.5% una respuesta de 33.3% de callo (Figura 17).





**Figura 17. % de callo obtenido en los diferentes tratamientos aplicados a explantes de pecíolo de *C. filaginoides*, n= 3**

Los tratamientos que promovieron una inducción del 100% fueron el 6, 9, 12, 14, 16, donde los tratamientos 6 (KIN 0.1 mg/L + PIC 1 mg/L) y 14 (BAP 0.1 mg/L + PIC 1 mg/L) proporcionaron las mejores características de callos (callos friables y sin oxidación) en comparación con los tratamientos restantes (Figura 20 b y 20 d).

### 7.2.3 Comparación de callos obtenidos de explantes de hoja y pecíolo

Se obtuvieron dos tipos de respuestas morfogénicas (callo y raíz) a partir del día 24 de cultivo.

Los tratamientos 1, 3, 5, 9, 7 y 15 mostraron un porcentaje por debajo del 50 en respuesta de callo en ambos explantes además de presentar características morfológicas no deseables (pronunciada oxidación y callos compactos) por lo cual no es recomendable el empleo de 0.1 mg/L de las auxinas ANA, AIA, 2,4 D y picloram en combinación con las citoquininas KIN y BAP para la inducción a callogénesis en la especie en estudio. Es importante mencionar que el 3 (0.1 mg/L KIN y 0.1 mg/L 2,4-D) de explante de hoja fue el único que proporciono callos color verde y friables (Figura 18), tal respuesta puede ser atribuible a la presencia de 2,4-D, ya que tal regulador aparentemente brinda estímulo para iniciar la callogénesis

Roca & Mroginski, (1991) y es conocido por su potente efecto para la obtención de callo (Martínez *et al.*, 2007), por lo cual este RCV ha sido ampliamente utilizado en diversas especies de plantas, incluyendo a las pertenecientes a la familia Asteraceae como *Wedelia chinensis* (Dhas *et al.*, 2016) y *Stevia rebaudiana* (Gupta *et al.*, 2010).



**Figura 18. Respuesta morfogénica de callo del tratamiento 3 de explante de hoja**

El empleo de las auxinas ANA, 2,4 D y AIA en concentración de 1 mg/L en combinación con las citoquininas KIN y BAP promueven exitosamente la obtención de callo (>50% callogénesis) en ambos explantes, sin embargo, los cultivos presentan poca friabilidad y pronunciada oxidación (Figura 19). La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro* puede desencadenarse por distintos factores como los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo (Azofeifa *et al.*, 2009), o bien también puede estar influenciado por el tipo, combinación y concentración de reguladores del crecimiento (desbalance) agregados al medio de cultivo, lo cual puede generar un estrés oxidativo, de tal manera, que los ROS generados alteran diferentes vías metabólicas y respuestas fisiológicas del explante, pudiendo incluso llevarlo a su muerte (George, 1996; Van Staden *et al.*, 2006). Los resultados del presente estudio confirman esto último, ya que la oxidación de los cultivos fue visible en los medios donde se indujo a callogénesis por medio de las auxinas ANA, 2,4-D y AIA, presentando visible oxidación aproximadamente al sexto día de subcultivo, sin embargo, los cultivos donde se empleó la auxina picloram se encontraron libres de oxidación inclusive a las 20 semanas de cultivo.

Existen muchas alternativas para combatir la oxidación de los cultivos, por mencionar algunas, se encuentran el aumento de antioxidantes en la preparación del explante para su cultivo o en el medio de cultivo (Azofeifa *et al.*, 2009), uso de carbón activado en el medio de cultivo (Harikrishnan *et al.*, 1997), la sustitución del regulador de crecimiento o la implementación de subcultivos (transferencias) frecuentes a un medio de cultivo fresco (George, 1996), esta ultima alternativa fue aplicada en el presente estudio, no obstante, es un procedimiento demandante de tiempo y reactivos, por lo es recomendable emplar otra alternativa para evitar el deterioro de los cultivos (George, 1996).



**Figura 19. Oxidación de células de cultivo de callo del tratamiento 10 (explante de hoja**

Por otra parte los resultados de callo evidencian que existe una relación directamente proporcional en el aumento de la concentración de las auxinas ANA, AIA, 2,4 D y picloram de 0.1 a 1.0 mg/L en combinación con una citocinina (BAP o KIN), en el aumento de la división celular en explantes de hoja y pecíolo de la especie en estudio, corroborando lo obtenido por Tisserat (1985), el cual demostró que la producción de callos está íntimamente ligada a la adición de auxinas al medio de cultivo, y que este efecto podría verse potencializado por la adición conjunta de auxinas y citocininas en el mismo medio de cultivo.

Otros estudios han reportado la obtención de porcentajes considerables de callos con el uso de la auxina ANA, Sanchez *et al.*, (2018) determinaron que 1.0 mg /L ANA + 0.1 mg/L KIN es la mejor combinación para obtener el máximo porcentaje de formación de callo de apariencia friable y de color beige (81.7%) en explantes de hoja de *Ageratina pichinchensis* (Asteraceae), por otro lado, explantes de hoja de

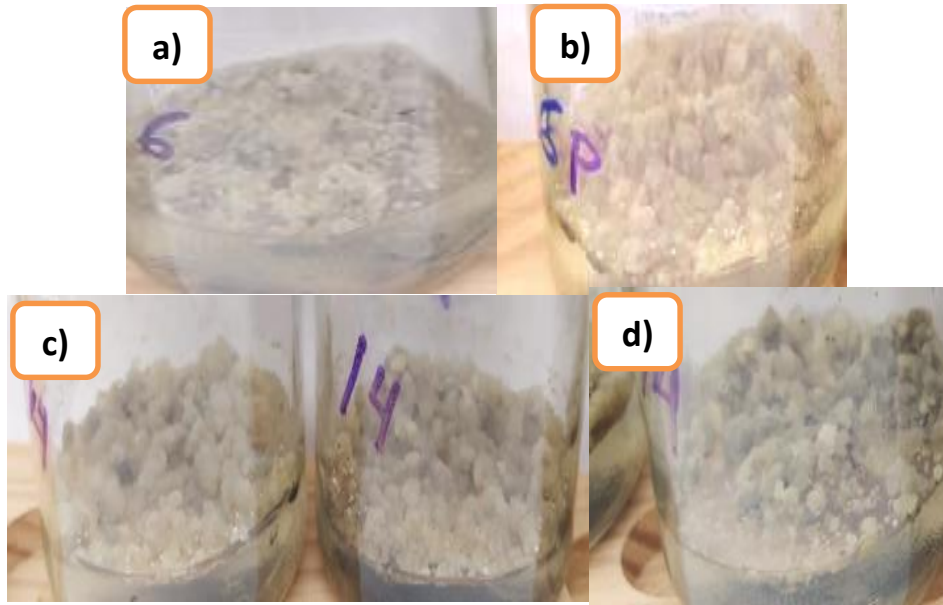
*Saussurea obvallata* (Asteraceae) proporcionaron una respuesta del 100% de callogénesis por medio de la combinación 2.5  $\mu$ M BAP + 1.0  $\mu$ M ANA (Dhar & Joshi, 2005). En la especie *Ophiorrhiza mungos* (Rubiaceae) 10.74  $\mu$ M ANA + 4.44  $\mu$ M BAP se seleccionó como la mejor combinación para la máxima producción de callo amarillo y friable (en explantes de hoja) (Krishnan *et al.*, 2019).

En explantes de hojas de *Wedelia chinensis* se encontró que 1 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L de BAP proporciona callos friables y de color blanco verdoso (Dhas *et al.*, 2016). Gupta *et al.*, (2010) concluyeron que la combinación 0.75 mg/L de ANA + 1 mg/L de 2,4-D proporciona la máxima producción de callos en explantes de hojas de *Stevia rebaudiana*, por otra parte Pace *et al.*, (2009) desarrollaron un protocolo de micropropagación eficaz para *Leontopodium nivale* donde indujeron callos en medio MS suplementado con 1.0 mg/L de 2,4-D a partir de explantes de cotiledones.

Son muy escasos los reportes del empleo de AIA como regulador de crecimiento vegetal (RCV) para la inducción a callogénesis en plantas, sin embargo, Pola *et al.*, (2019) evaluaron el efecto del ácido indol-3-acético (AIA) y tipo de explante en callogénesis de girasol (*Helianthus annuus* L.), para ello cultivaron explantes de cotiledón, hipocótilo y raíz en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con las concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 mg/L de AIA, logrando la formación de callos con todos los explantes en las concentraciones evaluadas (0.1, 0.5 y 1 mg/L) estableciendo a AIA como único regulador de crecimiento para la inducción de callos en explantes de girasol, en todos los callos se observó formación de raíces primarias y adventicias. La concentración de AIA que indujo una formación constante de raíces fue 0.1 mg/L con 72%, mientras que la más baja fue la de 0.5 mg/L con 52%. De acuerdo a lo reportado por Pola *et al.*, (2019) y los resultados observados en el presente estudio en explantes de hoja y pecíolo de *C. filaginoides* donde se observó como respuesta la formación de raíces en el tratamiento 8 (0.1 mg/L KIN + 1 mg/L AIA) es posible señalar que el AIA induce la formación de raíces a concentraciones bajas (1 mg/L) en diferentes explantes de especies de la familia Asteraceae, más

adelante se discuten a fondo los resultados de la especie en estudio referentes a la obtención de raíces.

Por otra parte los tratamientos 6 (0.1 mg/L KIN + 1 mg/L PIC) y 14 (0.1 mg/L BAP + 1 mg/L PIC) presentaron mejores características morfológicas en comparación con los tratamientos restantes tanto para hoja como pecíolo, se pudo observar que los callos de tales tratamientos presentaban una apariencia friable y verde, células sin oxidación y % alto de callogénesis (100% de callogénesis) cabe resaltar que en ambos tratamientos se emplea el RCV picloram en una concentración 1 mg/L (Figura 20 a, b, c y d) , sin embargo, el empleo de concentraciones menores (0.1 mg/ L PIC) de tal regulador afecta significativamente las características morfológicas de los cultivos proporcionando callos compactos y pronunciada oxidación, lo cual fue visible en los tratamientos 5 (0.1 mg/L PIC+ 0.1 mg/L KIN) y 13 (0.1mg/L PIC+ 0.1 mg/L BAP). Estos resultados son similares a los obtenidos por Suárez y Salgado (2008) en donde demostraron que el suplemento de la auxina ácido naftalenacético (ANA) en el medio de cultivo es necesario y suficiente para inducir callo a partir de explantes consistentes de entrenudos de *Stevia rebaudiana*, sin embargo, determino que el mayor porcentaje de friabilidad se obtuvo en el tratamiento con la combinación 0.5 mg/L de ANA (auxina) + 4.0 mg/L de BAP (citocinina), mientras que los valores más bajos en esta variable ocurrieron cuando el medio estaba desprovisto de citocinina BAP, concluyendo que los bajos porcentajes de friabilidad en presencia de la auxina ANA solamente indica la necesidad de la interacción de auxinas y citocininas en el medio para obtener tejidos friables. De acuerdo a lo anterior se puede decir que la interacción de la auxina PIC con KIN y BAP promueve la obtención de callos friables, donde la primera proporciona un alto porcentaje de callogénesis mientras que KIN y BAP ayudan a mantener la friabilidad.



**Figura 20. Respuesta morfo genética de callo, a) explante de hoja tratamiento 6, b) explante de pecíolo tratamiento 6, c) explante de hoja tratamiento 14 y d) explante de pecíolo tratamiento 14.**

Hasta el momento la auxina picloram ha sido escasamente usada en especies de la familia Asteraceae, sin embargo, el uso de este RCV ha proporcionado resultados exitosos en la inducción de callogénesis incluso frente a las auxinas AIA, ANA y 2,4-D en explantes de especies de otras familias; en *Eurycoma longifolia* se obtuvieron porcentajes considerables de callo, para explantes de hoja con 1.0 mg/L de 2,4-D (81.67%), seguido de picloram (78.33% a 3.0 mg/L) y ANA (61.67% a 4.0 mg/L), por otra parte 2,4-D y picloram a 4.0 mg/L resultaron ser más efectivos para la inducción de callos en explantes de pecíolo (78.33%), seguido de (73.33% a 2.0 mg/L), ANA (73.33% a 3.0 mg/L) y AIA (61.67% a 3.0 mg/L) (Mahmood *et al.*, 2010). Se llevó a cabo la inducción de callo en pecíolo y hojas de *Lamprocapnos spectabilis* mediante varias combinaciones y concentraciones de BAP, AIA, ANA, 2,4-D y picloram (PIC), al evaluar la respuesta morfo genética obtenida se determinó que no hubo influencia del tipo de explante en la eficiencia de la callogénesis (62.1-65.3%) y que el mayor peso de porcentaje de callo se produjo en explantes de hojas en presencia de PIC (Kulus & Tymoszuk, 2020) , mismos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio, ya que no se observaron diferencias en el

porcentaje de callo obtenido en explantes de pecíolo y hoja con las combinaciones (0.1 mg/L KIN + 1 mg/L PIC) y (0.1 mg/L BAP + PIC 1 mg/L PIC). En la amapola de maíz (*Papaver rhoeas* L.) se indujo a callogénesis explantes de raíz, hipocótilo, cotiledón, pecíolo y hojas con diferentes concentraciones y combinaciones de las auxinas picloram, ANA y 2,4-D (0.5 y 1.0 mg/L) y las citoquininas BAP y KIN (0.1 y 0.5 mg/L), obteniendo los mejores resultados para la inducción de callos en explantes de pecíolos y hojas en medio MS que contenía 1.0 mg/L picloram y 0.1 mg/L BAP (89.2%) (Aghaali *et al.*, 2019), así mismo en explantes de cotiledones de la especie *Hylocereus costaricensis* se probaron 36 tratamientos con diversas concentraciones de ANA y Thidiazuron (TDZ), picloram y 2,4-D, determinando que la concentración de 10 µM de picloram fue eficaz para la proliferación de callos friables (Winson *et al.*, 2020), mientras que Park *et al.*, (2020) probaron 100 combinaciones de diferentes concentraciones de los RCV (TDZ, ANA, 2,4-D y BAP) para la inducción a callogénesis en explantes de hojas, tallos y raíces de *Sophora flavescens*, observando una tasa del 100% de callo en todas las concentraciones probadas de TDZ y picloram, mientras que en combinaciones de BAP y picloram se observaron callos friables.

Estos últimos reportes y los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que el RCV picloram promueve la obtención de altos porcentajes de callogénesis, además de callos friables, por lo que es ampliamente recomendable su empleo para la formación de callo en la especie *C. filaginoides*.

Comparando los resultados obtenidos en el presente estudio con los reportados en otras investigaciones, se concluye que la variación en las respuestas de callo obtenidas de las diferentes concentraciones y combinaciones de las auxinas ANA, 2,4-D, AIA y picloram con las citoquininas BAP y KIN, es una cuestión que depende de la especie, del cultivo empleado e incluso del explante (Kulus & Tymoszuk, 2020).

La elección del tratamiento con la mejor respuesta de callo está en función del alto % callogénesis (100% callogénesis) y friabilidad, por lo cual las combinaciones de los tratamientos 6 (0.1 mg/L KIN + 1 mg/L PIC) y 14 (0.1 mg/L BAP + 1 mg/L PIC) son recomendables para la inducción a callo en la especie *C. filaginoides* en ambos explantes. Por otro lado, cabe mencionar la importancia de analizar el perfil fitoquímico de estos últimos tratamientos (6 y 14) para establecer la combinación de RCV y el tipo de explante (hoja y pecíolo) que permita obtener la mejor respuesta de callogénesis con la posible producción de metabolitos de interés.

### 7.2.3.1 Formación de raíces

La combinación de 0.1 mg/L KIN y 1 mg/L AIA promovió la obtención de raíces (Figura 21) en un 33.3% y 25% en explantes de pecíolo y hoja, respectivamente, tal respuesta puede deberse al empleo del regulador de crecimiento vegetal AIA el cual se ha reportado mediante diversos estudios de inducción a callogénesis en especies de la familia Asteraceae que favorece la respuesta morfogenética de raíz ; Rout y Sahoo (2013) utilizaron brotes alargados de *E. scaber* en medio MS suplementado con la auxina AIA para la inducción de raíces; Ahmed *et al.*, (2007) informaron sobre inducción de brotes *in vitro* a partir de segmentos nodales de *S. rebaudiana* empleando diferentes concentraciones de las auxinas IBA, ANA e AIA, donde AIA a 0.1 mg/L produjo el porcentaje de enraizamiento más alto (97.66%); por otra parte Karakas y Turker (2013) enraizaron brotes regenerados de *B. perennis* en medio MS fortificado con AIA (1.0 mg/L).



**Figura 21. Respuesta morfogenética de raíz del tratamiento 8 de explante de hoja**



De acuerdo a lo mencionado anteriormente incluso entre especies de la misma familia se obtienen respuestas morfogénicas variadas empleando la misma concentración de reguladores de crecimiento, en el presente estudio se obtuvo la respuesta morfogénica de raíz con la concentración de 1.0 mg/L de AIA (tratamiento 8) mientras que la concentración de 0.1 mg/L de AIA (tratamiento 7) no indujo ninguna respuesta morfogénica, es importante mencionar que los tratamientos del presente estudio se combinaron con 0.1 mg/L de KIN, por otra parte las mismas concentraciones de AIA (0.1 mg/L y 1 mg /L) en combinación con la citocinina BAP proporcionaron una respuesta de callogénesis, todo lo anterior se puede atribuir a la variación genética existente incluso entre especies de la misma familia, otro factor que interviene en la respuesta puede ser el tipo de citocinina (KIN o BAP) que en interacción con la auxina AIA promueven la obtención de diferentes respuestas morfogénicas (callo o raíz).

Por último, la respuesta morfogénica de raíz obtenida en el presente estudio concuerda con lo mencionado por Pierik (1990) el cual indica que AIA es una hormona que se produce de forma natural en las plantas ,y se añade en concentraciones de 0.1 a 10 mg/L produciendo generalmente elongación celular y expansión de tejidos, división celular (formación de callo), formación de raíces adventicias y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión y que las auxinas sintéticas relativamente más activas ANA, AIB y 2,4-D se utilizan en concentraciones más bajas que AIA (considerada una auxina débil), lo anterior explica la diferencia de resultados obtenidos en el presente estudio entre tratamientos donde se empleó este último regulador, ya que al aumentar la concentración de AIA a 1 mg/L (tratamientos 8 y 16) se obtuvieron las respuestas morfogénicas raíz y callo en ambos explantes de hoja y pecíolo de *C. filaginoides*, mientras que los tratamientos donde se empleó una concentración de 0.1 mg/L de AIA (tratamientos 7 y 15) no indujeron ninguna respuesta morfogénica.

Debido a que el objetivo del presente trabajo, no está centrado en la obtención de raíz como respuesta morfogénica, para futuras investigaciones enfocadas en la

búsqueda de un aumento del % de raíz en la especie *C. filaginoides* se recomienda el empleo de un abanico más amplio de la de la auxina AIA en combinación con la citocinina KIN.

### **7.3. Perfil fotoquímico de los diferentes tratamientos de callo de explante de hoja y pecíolo de *C. filaginoides***

Ovalle *et al.*, (2014) reportaron que el extracto de la planta silvestre de *C. filaginoides* obtenido a partir de la mezcla diclorometano-metanol (1:1) posee altas cantidades de rutina (principal componente activo) y sus productos de hidrólisis (isoquercitrina y quercetina), para determinar si las células de cultivo *in vitro* (cultivo de callo) de *C. filaginoides* producen compuestos de la misma naturaleza que la planta silvestre, se analizó el perfil fotoquímico (cualitativo) de los extractos orgánicos de todos los tratamientos, por medio de cromatografía en capa fina empleando un sistema de elución diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): metanol (MeOH) 95:05 con revelado con luz UV y sulfato cérico amoniacal, este último revelador se empleó para poder visualizar los compuestos que no revelan con luz UV y tener un panorama más amplio en cuanto al perfil fitoquímico, como referencia se utilizaron los estándares comerciales de quercetina y rutina. Es importante mencionar que debido al tiempo y la falta de disponibilidad de materiales no se pudo analizar la presencia de rutina en los cultivos de callo.

En la cromatoplaqueta revelada con luz UV (Figura 23a) se puede observar que el extracto de la planta silvestre de *C. filaginoides* (E) mostró la presencia de quercetina, ya que presentó el mismo Rf= 0.36 que el estándar de quercetina (Q), sin embargo, no se identificó la presencia de este compuesto en ningún extracto de biomasa de cultivo de callo de la especie, por otra parte los tratamientos 2, 3, 6 y 14 de explante de hoja (Figura 22), mostraron un perfil fitoquímico similar a la planta silvestre por medio de ambos revelados (Figura 23 a y b), dentro de los cuales el tratamiento 6 mostró el perfil más completo con respecto a los demás tratamientos y el más similar al perfil de la planta silvestre, los extractos de los tratamientos

restantes no mostraron presencia de compuestos. Cabe resaltar que abundan los compuestos de mediana polaridad con respecto a los de alta polaridad lo cual es visible en ambos revelados.

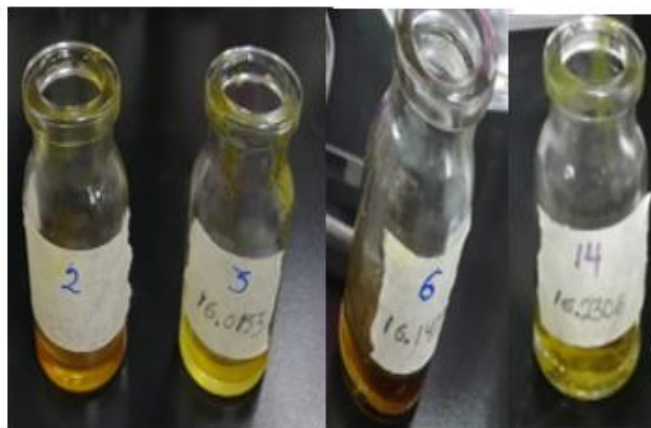


Figura 22. Extractos obtenidos de biomasa de cultivo de callo de los tratamientos 2, 3, 6 y 14, respectivamente.

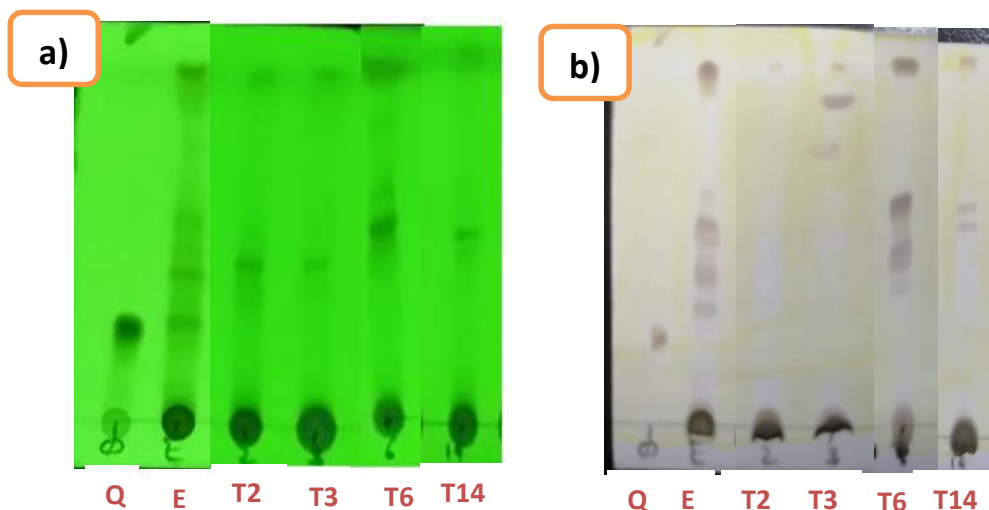


Figura 23. Cromatoplasmas de los extractos de cultivo de callo y planta silvestre de *C. filaginoides*

a= revelado con luz UV y b= revelado con sulfato cérico amoniacal donde Q= estándar de quercetina, E: extracto de planta silvestre, T2: tratamiento 2, T3: tratamiento 3, T6: tratamiento 6, T14: tratamiento 14.

La visualización de compuestos de mediana polaridad pueden significar la presencia de terpenos, ya que estos compuestos son extraídos generalmente con solventes de baja o mediana polaridad, además la especie *C. filaginoides* se caracteriza por producir metabolitos secundarios de la familia de los terpenos y polifenoles, especialmente flavonoides los cuales se encuentran dentro de este último grupo. La posible ausencia de flavonoides como la quercetina era de esperarse, ya que generalmente los flavonoides son producidos en tejidos vegetales diferenciados como cultivos de raíces y brotes, debido a que el cultivo de órganos produce patrones de metabolitos secundarios similares a los de las plantas silvestres (Jedinak *et al.*, 2004; Amer *et al.*, 2018).

Se ha comprobado que la producción y acumulación de flavonoides en cultivo de callos está estrechamente relacionada como respuesta ante condiciones de estrés al igual que en la planta silvestre (Gomez *et al.*, 2011).

### 7.3.1 Rendimiento de extractos de cultivo de callo y planta silvestre

Se determinó el rendimiento del extracto obtenido a partir de la planta silvestre (Tabla 17), así como también el de los extractos de cultivo de callo que presentaron un perfil fitoquímico similar a la misma (Tabla 18).

**Tabla 17. Rendimiento de extracto de la planta silvestre**

Tratamiento	Material vegetal seco(g)	Extracto total(g)	Rendimiento (%)
Planta seca	108.11	8.22	7.6

**Tabla 18. Rendimiento de extractos de biomasa de cultivo de callo de *C. filaginoides***

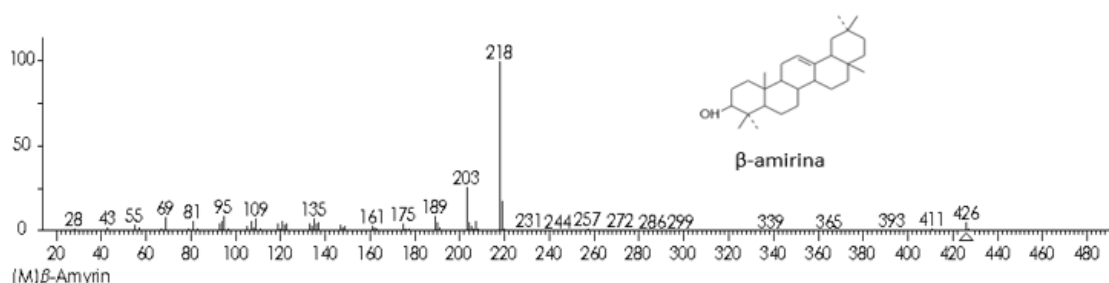
<b>Tratamiento</b>	<b>Biomasa seca(g)</b>	<b>Extracto total(g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
<b>2</b>	0.9273	0.2119	22.85
<b>3</b>	0.5305	0.1508	28.42
<b>6</b>	0.9843	0.3303	33.55
<b>14</b>	0.7085	0.1226	17.30

De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 17 y 18 se puede ver que los rendimientos de los extractos de biomasa de callo de los tratamientos 2, 3, 6 y 14 se encuentran considerablemente por arriba del rendimiento del extracto de la planta silvestre.

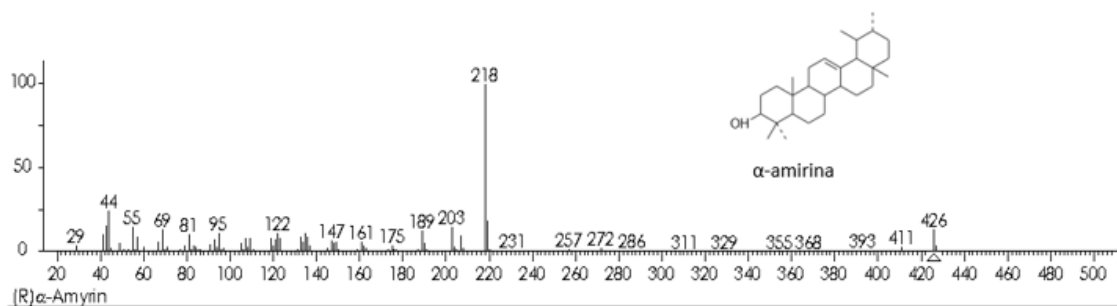
Con base a lo anterior se puede ver que el cultivo de tejidos de la especie *C. filaginoides* puede representar una opción viable para la producción de metabolitos secundarios de interés ofreciendo rendimientos de entre 3 y 4 veces mayores a la planta silvestre, esto último se pudo observar por medio de los tratamientos 3 y 6.

## 7.4 Identificación de compuestos en tratamientos de cultivo de callo por CG-MS

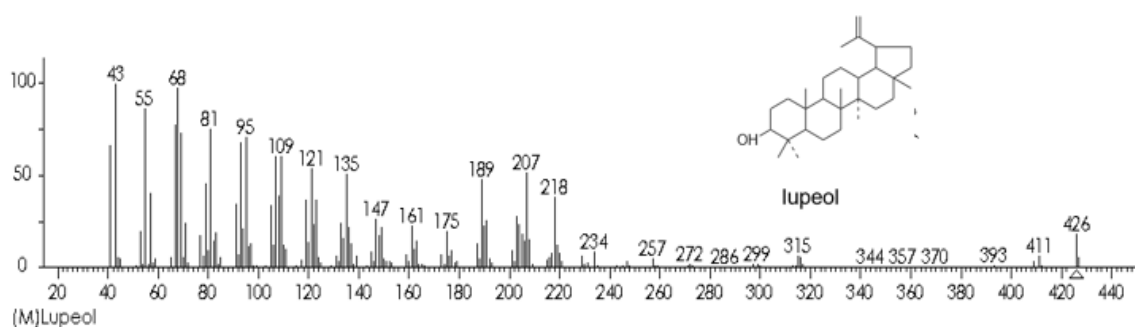
Se llevó a cabo la identificación de compuestos en los tratamientos 2, 3, 6 y 14 de explante de hoja por medio de la técnica de CG-MS, siendo el tratamiento 3 (0.1 mg/L KIN y 0.1 mg/L 2,4-D) (Figura 18) el que mostró la presencia de compuestos de interés, en este último se identificó la presencia de los triterpenos pentacíclicos (TP)  $\beta$ -amirina (Figura 24),  $\alpha$ -amirina (Figura 25), y lupeol (Figura 26), lo anterior concuerda con lo reportado por Domínguez *et al.*, (1972) los cuales llevaron a cabo la identificación y aislamiento de  $\beta$ -amirina a partir de extracto de éter de petróleo y MeOH obtenido de partes aéreas de la planta silvestre de *C. filaginoides*, por otro lado Mata *et al.*, (1997) y Calzada *et al.*, (2001) por medio de extracto de cloroformo-metanol (1: 1) de planta silvestre llevaron a cabo el aislamiento de tres terpenoides (eritridiol,  $\beta$ -cariofileno 4,5- $\alpha$ -óxido y 3- $\beta$ -tridecanoiloxi-28-hidroxi-oleano-1 2- eno) los cuales son compuestos de la misma naturaleza que los triterpenos pentacíclicos producidos por medio del cultivo *in vitro* de hojas de *C. filaginoides* en el presente estudio. De acuerdo a lo anterior se puede ver que el cultivo *in vitro* permite la producción de compuestos de la misma naturaleza que los presentes en la planta silvestre de *C. filaginoides*.



**Figura 24. Espectro de masas de  $\beta$ -amirina en extractos de diclorometano-metanol (1:1) tratamiento 3 obtenidas por CG-MS.**



**Figura 25. Espectro de masas de  $\alpha$ -amirina en extractos de diclorometano-metanol (1:1) tratamiento 3 obtenidas por CG-MS.**



**Figura 26. Espectro de masas de lupeol en extractos de diclorometano-metanol (1:1) tratamiento 3 obtenidas por CG-MS.**

La familia Asteraceae se caracteriza por poseer una gran diversidad de triterpenoides (Shao *et al.*, 1995); especies silvestres como *Piptocarpha axillaris* (Less.) Baker (Pereira *et al.*, 2019), *Lactuca sativa* (Choi *et al.*, 2020), *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng.) R.M. King & H. Rob (De Amorim *et al.*, 2016) y *Calendula officinalis* (familia Asteraceae) (Nizynski *et al.*, 2015), *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob (Rao & Rao, 2015), *Eclipta alba* (Upadhyay *et al.*, 2000), *Spilanthes acmella* (Krishnaswamy *et al.*, 1975), junto con ejemplares del género *Conyza* como *C. linifolia* (Harras *et al.*, 1988) y *C. aegyptiaca* (Metwally *et al.*, 1989), son ejemplos de plantas de la familia en las que se ha encontrado la presencia de  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina y Lupeol; asimismo en *Chromolaena hirsuta* (Contini *et al.*, 2004) y *Scorzonera latifolia* (Acikara *et al.*, 2018) se identificó la presencia de lupeol y  $\alpha$ -Amirina, mientras que en *Senecio gossypinus* de  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina (Razafindrakoto *et al.*, 2020).

A pesar de que existen muchas especies silvestres de la familia que producen estos compuestos, aún son escasos los estudios de cultivo de callo productores de estos TP, en su forma libre. En la tabla 19 se muestra información detallada acerca de este tema.

**Tabla 19. Especies de plantas productoras de  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina y lupeol por medio de cultivo de callo**

<b>Especie familia</b>	<b>/ Explante utilizado</b>	<b>RCV empleados</b>	<b>TP identificados en cultivo de callo</b>	<b>Referencia</b>
<i>Vernonanthura patens</i> (Kunth) H. Rob (Asteraceae)	Hoja	1.0 mg / L de BAP + 0.5 mg / L de 2,4-D	Lupeol	Chóez <i>et al.</i> , 2019
<i>Ageratina Pichinchensis</i> (Asteraceae)	Hoja	1.0 mg /L NAA + 0.1 mg /L KIN	Lupeol	Sánchez <i>et al.</i> , 2018
<i>Hemidesmus indicus</i> (Apocynaceae)	Hojas y raíces	Diferentes combinaciones de ANA+ KIN y 2,4 D+ BAP	Lupeol	Misra <i>et al.</i> , 2005.
<i>Eclipta alba</i> (Asteraceae)	Tallo	3.0 mg / L de BAP + 1.0 mg / L de NAA	$\beta$ -amirina	Khurshid <i>et al.</i> , 2018
<i>Spilyanthes acmella</i> (Asteraceae)	Brotes	0.5 mg/L BAP + 2.0 mg./L 2, 4-D	$\alpha$ -amirinay $\beta$ -amirina	Ekhlas <i>et al.</i> , 2020

Con base a las investigaciones citadas (tabla 19), se puede observar que cultivos de callos de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob y *Hemidesmus indicus* produjeron lupeol, sin embargo, en las plantas silvestres se identificó la presencia de lupeol,  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina, en tallo, hojas y flores de *V.patens* y raíces y tallo



de *H. indicus* (Manjulatha *et al.*, 2014; Rao & Rao ,2015) ; en *Eclipta alba* y *Spilyanthes acmella* se identifico  $\beta$ -amirina, y  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina, respectivamente, mientras que en su medio natural ambos ejemplares producen  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina en sus partes aéreas (Upadhyay *et al.*, 2000; Krishnaswamy *et al.*, 1975). En el presente estudio células de cultivo de callo de hoja de *C. filaginoides* obtenidas mediante la combinacion 0.1 mg/L KIN y 0.1 mg/L 2,4-D evidenciaron la presencia de los tres TP (lupeol,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina), mientras que solo se aislo e identifico  $\beta$ -amirina en la planta silvestre (Domínguez *et.al.*, 1972). De acuerdo a lo anterior es posible ver que los cultivos celulares de plantas no siempre producen los mismos metabolitos secundarios que las plantas madre (Orihara y Ebizuka, 2010). Los tejidos u órganos de plantas cultivadas suelen mostrar perfiles de fitoquímicos diferentes y, a veces, impredecibles, en particular metabolitos secundarios, en comparación con las plantas naturales, inclusive por medio de la técnica de cultivo *in vitro* es posible la formación de metabolitos secundarios que no produce la especie en su medio natural, lo cual se debe a la presencia de RCV, ya que estos afectan el metabolismo de las plantas y la síntesis de compuestos químicos. En general, se considera que los reguladores del crecimiento de las plantas no reaccionan con compuestos intermedios de rutas biosintéticas, pero parecen cambiar las condiciones citoplasmáticas para la formación del producto (Misra *et al.*, 2005). Con base a los estudios referenciados y los resultados de la especie en estudio es posible señalar que los RCV 2,4-D y ANA inducen la formación de esqueletos de triterpenos ( $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina y lupeol) particularmente en especies de la familia Asteraceae.

Estos tres compuestos son representativos de la familia de los TP, y se ha demostrado que los esqueletos de tales compuestos se ciclan a partir del 2,3-oxidoscualeno, un precursor común de fitoesteroles y triterpenoides (Abe *et al.*, 1993). Recientemente estos triterpenos han atraído mucha atención debido a su actividad hepatoprotectora, antihiper glucémica, hipolipidémica, antiinflamatoria y anticancerígena (Gallo & Sarachine, 2009; Melo *et al.*, 2011; Siddique & Saleem, 2011; Chen *et.al.*, 2017; Ramos *et al.*, 2018), entre otras, motivo por el cual en las

últimas décadas, se han desarrollado varias estrategias para obtener estos tres TP naturales, como la síntesis química (Chen *et.al.*, 2017) y el uso de tecnologías emergentes (Ramos *et al.*, 2018). Esta última busca mejorar los métodos clásicos de extracción en la planta, dentro de las cuales se encuentran extracción asistida por ultrasonido (EAU), la extracción de alta presión hidrostática (HHPE) y la extracción asistida por microondas (MAE) , sin embargo, a pesar de que estos métodos ofrecen ciertas ventajas sobre la extracción convencional como la disminución de los tiempos de extracción, el consumo reducido de solventes y energía y la prevención de la contaminación ambiental (Barrera, 2015), siguen siendo procedimientos complejos de extracción y aislamiento, que conducen a un bajo rendimiento de los compuestos de interés, ya que desafortunadamente, los metabolitos secundarios, incluidos los triterpenos, se producen a una concentración muy baja en las plantas (Ghosh, 2016); por otra parte la síntesis química, es una opción económicamente no competitiva debido a que en la mayoría de los casos los triterpenoides pentacíclicos tienen estructuras complejas, lo cual dificulta o imposibilita su síntesis (James y Dubery, 2009).

Las enzimas involucradas en la formación de  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina y lupeol se denominan oxidoscualeno ciclasas (OSC) (Huang *et al.*, 2012) y son usadas por la ingeniería enzimática para la producción de estos triterpenos. Phillips *et.al.*, (2006) reportan que se ha llevado a cabo la clonación de más de 30 genes que codifican las enzimas OSC, mientras que la secuenciación del genoma de *A. thaliana* (Brassicaceae) y *Taraxacum officinale* (Asteraceae) reveló la presencia de múltiples copias de genes OSC en estas plantas. En todas ellas, la  $\beta$ -amirina se produce no solo por sintetasas específicas de productos sino también por OSC multiproducto. La función enzimática de las OSC de *T. officinale* se expresó en una cepa de *S. cerevisiae* (Shibuya *et al.*,2009). Por otra parte, se ha utilizado diferentes sustancias como inductores para estimular la actividad de OSC y la biosíntesis de saponinas como en el caso de las células cultivadas de *G. glabra* con jasmonato de metilo (Cammeri, 2008); lo cual muestra que uno de los beneficios particularmente importantes del cultivo de células vegetales es la capacidad potencial para

manipular y mejorar la producción de compuestos deseados dentro de la célula vegetal mediante la experimentación con cultivos celulares (James y Dubery, 2009).

Es importante mencionar que hasta el momento no se ha reportado de especies de plantas que produzcan los tres triterpenos pentacíclicos lupeol,  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina conjuntamente, mediante la técnica de cultivo *in vitro*. Cabe resaltar que el presente estudio tiene como principal ventaja la producción de estos tres triterpenos pentacíclicos mediante una misma combinación de reguladores de crecimiento 0.1 mg/L KIN y 0.1 mg/L 2,4-D. Los hallazgos encontrados en el presente estudio apoyan la producción de estos tres triterpenos pentacíclicos a través del cultivo *in vitro* de la especie *C. filaginoides* bajo condiciones controladas, además tales hallazgos pueden aportar información a otras disciplinas como la ingeniería enzimática para comprender todos los pasos enzimáticos en la vía biosintética de los triterpenoides que conducen a la producción de estos compuestos biológicamente activos por una sola técnica (por medio del estudio de las células indiferenciadas de callo de *C. filaginoides*) y una vez que se identifiquen los genes clave por medio de ingeniería genética facilitar su manipulación y regulación como una alternativa para la producción de tales metabolitos secundarios (lupeol,  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina).

## 8. CONCLUSIONES

- El tratamiento C proporciona el porcentaje más alto de desinfección y germinación en semillas de la especie *C. filaginoides* con un 100% y 72.18%, respectivamente.
- La combinación 0.1 mg/L KIN y 1 mg/L PIC (tratamiento 6) proporciona una alta división celular y friabilidad en cultivos de tejidos de hoja de la especie *C. filaginoides*, además de un perfil fitoquímico más completo en comparación con los tratamientos restantes.
- La combinación de 0.1 mg/L KIN y 1 mg/L AIA promovió la obtención de raíces en un 33.3% y 25% en explantes de pecíolo y hoja, respectivamente
- Células de cultivo de callo (explante de hoja) obtenidas a partir de la combinación 3 (0.1 mg/L KIN y 0.1 mg/L 2,4-D) permiten la producción de metabolitos secundarios (triterpenos pentacíclicos) con diversas actividades farmacológicas.
- Extractos de biomasa de cultivos de callo de los tratamientos 3 y 6 producen rendimientos de entre 3 y 4 veces mayores a la planta silvestre, respectivamente.
- Cultivos *in vitro* de la especie *C. filaginoides* permiten la producción de compuestos bioactivos de la misma naturaleza que los identificados en la planta silvestre.

## 9. PERSPECTIVAS

- Llevar a cabo la cuantificación de lupeol,  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina en extractos de cultivo de callo de hoja del tratamiento 3 (0.1 mg/L KIN y 0.1 mg/L 2,4-D) y determinar el rendimiento de cada uno de los compuestos.
- Establecer el cultivo de células en suspensión de los tratamientos 3 y 6, a partir del cultivo de callos de hoja de la especie *C. filaginoides*.
- A partir de extractos de biomasa de células en suspensión (explante de hoja) de los tratamientos 3 y 6, identificar y cuantificar por medio de diversas técnicas analíticas la posible presencia de metabolitos de interés.
- Evaluar la actividad farmacológica de los extractos de interés de cultivo de callo y/o células en suspensión de *C. filaginoides*.

## 10.REFERENCIAS

- Abe, I., Rohmer M., Prestwich, G. (1993). Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chem Rev*, 93(6) ,2189–2206.
- Abraham, J y Thomas, T. (2015). Plant regeneration from organogenic callus ad assessment of clonal fidelity in *Elephantopus scaber* Linn., an ethnomedicinal herb. *Physiol Mol Biol Plants* 21(2), 269-277.
- Acevedo & Estrada. (1995). *Estudio químico y biológico preliminar de Conyza filaginoides (D.C.) Hieron (Asteraceae)*. Universidad Autónoma Nacional de México. Facultad de Química. Ciudad de México, México.
- Acikara O., Özbilgin S., Işcan G., Acqua S., Rjašková V., Özgökçe F., Suchý V. y Šmejkal K. (2018). *Phytochemical Analysis of Podospermum and Scorzonera n-Hexane Extracts and the HPLC Quantitation of Triterpenes. Molecules*, 23.
- Agarwal M, Kamal R. (2007). Studies on flavonoid production using in vitro cultures of *Momordica charantia* L. *Indian J Biotechnol* 6:277–279.
- Agency for Toxic Substances & Disease Registry (ATSDR). (2002). *Peróxido de hidrógeno*. [http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts174.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts174.html) (14 de noviembre de 2020).
- Aghaali A, Hoshino Y., Monfared S. y Moieni A. (2019). Regulation of dedifferentiation and differentiation in different explants of *Papaver rhoeas* L. by one-step cultura. *Scientia Horticulturae*. 246, 366-370.
- Aguirre, G., Pierre J y Leigue, L. (2016). *Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos*. Universidad mayor de San Simón. Cochabamba – Bolivia.
- Ahmed, M.B., Salahin, M., Karim, R., Razvy, M.A., Hannan, M.M., “Sultana, R., Hossain, M y islam, R. (2007). An efficient method for *in vitro* clonal propagation of a newly introduced sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) in Blangladesh. *Am Eurasian J Sci Res*, 2(2), 121-125.

- Akhtar M. y Swamy M., (2019), *Natural Bio-active Compounds: Biotechnology, Bioengineering, and Molecular Approaches*. Volumen 3, Singapur, Springer.
- Alamgir, A. (2018). *Methods of Qualitative and Quantitative Analysis of Plant Constituents*. Springer. Sheffield, UK: 721-804
- Alcantara, J., Godoy, J., Cortés., D y Mora, M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*, 17 (32): 109-129.
- Alia Amer. (2018). "Biotechnology approaches for in vitro production of flavonoids", *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences Agricultural Research Center*, 7 (5):457-463.
- Almeyda A. (2017). *Estudio de la acumulación de ácido betulínico y urechitol A durante el desarrollo de Pentalinon andriexuxii y su relación con la metilación e ADN. (Tesis de maestría)*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Merida Yucatán.
- Alvarez, M. (2014). *Plant Biotechnology for Health. From Secondary Metabolites to Molecular Farming*. Buenos Aires, Argentina: Springer:15-31
- Amador, K., Diaz, J., Cornejo, S., Bivián, Eglá. (2013). Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de ferocactus (cactaceae). *Polibotánica*, 35:109-131
- Amoo S. y Staden J. (2013). Influence of plant growth regulators on shoot proliferation and secondary metabolite production in micropropagated *Huernia hystrix*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 112:249–256.
- Anand, R., Patnaik, G., Kulshreshtha, D y Dhawan, B. (1994). Antiuro lithiatic Activity of Lupeol, the Active Constituent Isolated from *Crateva nurvala*. *Phytotherapy Research*, 8:417-421.
- Anitha S, Kumari BDR. (2006). Stimulation of reserpine biosynthesis in the callus of *Rauvolfia tetraphylla L.* by precursor feeding. *Afr J Biotechnol* 5:659–661.

- Anjusha S. y Gangaprasad A., (2017). Callus culture and in vitro production of anthraquinone in *Gynochthodes umbellata* (L.) Razafim. & B. Bremer (Rubiaceae). *Industrial Crops and Products*, 95, 608-614.
- Ansari M., Chung I., Rajakumar G., Alzohairy M., Almatroudi A., Khanna V. y Thiruvengadam M. (2019). Evaluation of Polyphenolic Compounds and Pharmacological Activities in Hairy Root Cultures of *Ligularia fischeri* Turcz. f. *spiciformis* (Nakai). *Molecules*, 24.
- Arias, M. (2013). *Optimización de parámetros de cultivo en suspensión de células de la especie vegetal thevetia peruviana y su efecto en la producción de metabolitos secundarios*. Facultad de ciencias, Universidad nacional de Colombia. Medellín, Colombia.
- Arias, M., Angarita, M., Aguirre, A., Restrepo, J y Montoya, C. (2009). Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. *Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 62(1), 4881–4895.
- Arya D, Patn V, Kant U. (2008). *In vitro* propagation and quercetin quantification in callus cultures of Rasna (*Pluchea lanceolata* Oliver & Hiern.). *Indian J Biotechnol* 7:383–387.
- Astani A., Reichling AJ. Y Schnitzler P. (2010). Comparative Study on the Antiviral Activity of Selected Monoterpenes Derived from Essential Oils. *Wiley InterScience*. 24: 673–679.
- Avendaño, O y Sangama, M. (2017). “Aislamiento e identificación de alcaloides de la corteza del tronco y corteza de la raíz de remo caspi *Aspidosperma camporum* (Müll.Arg.) utilizado como antiparasitario”. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Iquitos, Perú.
- Azofeifa A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 20 (1), 153-175.
- Baldi A, Dixit VK. (2008). Enhanced artemisinin production by cell cultures of *Artemisia annua*. *Curr Trends Biotechnol Pharmacol* 2:341–348.



- Baltz, R., Davies, J., Demain, A. (2010). *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology (3rd Edition)*. American Society for Microbiology (ASM). Editorial ASM Press. Washington USA: 96-198.
- Barampuram, S., Allen, G y Krasnyanski, S. (2014). Effect of various sterilization procedures on the *in vitro* germination of cotton seeds. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 118:179–185.
- Barnett, J.P. 1998. *Desinfecting seeds with hydrogen peroxide*. <http://www.sfw.su.edu/sfnmc/class/fy614/peroxide.html>. 3 pp.
- Barrera F. (2015). *Métodos alternativos para la extracción y purificación de productos naturales de interés para la industria farmacéutica*. (Tesis de doctorado). Universidad nacional de córdoba, Córdoba, Argentina.
- Baser K. H. C. y F. Demirci. (2006). *Flavours and fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Heidelberg, Alemania: Springer-Verlag Berlín, p.p. 43,86.
- Bhalla, R, Narasimhan K, Swarup S. (2005). Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. *Plant Cell Rep* 24:562-571
- Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). *Simonilla*. Recuperado el 17 de octubre de 2018, de [www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx) > FMIM
- Boncan D., Tsang S., Li C., Lee I., Lam H., Chang T. y Hui J. (2020). Terpenes and Terpenoids in Plants: Interactions with Environment and Insects. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21.
- Brett J West, Stephen K Palmer, Shixin Deng, Afa K Palu. (2012). Antimicrobial Activity of an Iridoid Rich Extract from *Morinda citrifolia* Fruit. *Current Research J Biol Sci*, 4: 52-54.
- Busto, V (.2010). *Procesos fitofermentativos para la producción de antraquinonas por suspensiones celulares de *Rubia tinctorum**. Universidad de Buenos Aires.
- Calzada, F., Cedillo, R and Mata. (2001). Antiprotozoal Activity of the Constituents of *Conyza filaginoides*. *J. Nat. Prod.* 64(5), 671-673.

- Cammeri, M., Pecchia., Corea, G., Lanzotti, V., Ibeas, J., Tava, J., Conicella, C. (2008). Molecular characterization of  $\beta$ -amyrin synthase from *Aster sedifolius* L. and triterpenoid saponin analysis. *Plant Science*, 175(3), 255–261.
- Cao H., Xu H., Zhu G. y Liu S. (2017). Isoquercetin ameliorated hypoxia/reoxygenation-induced H9C2 cardiomyocyte apoptosis via a mitochondrial-dependent pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 938–943.
- Caraballo, D. (2015). “Cultivo de callos *in vitro* a partir de las hojas de *Jodina Rhombifolia* Hook. & Arn. (Reissek) para Obtención de C-Glicosilflavonas”. Universidad de la plata. Facultad de Ciencias Exactas. Buenos Aires, Argentina
- Carrasco R., Schmidt G., Lopez A., Sartoretto J., Caparroz S., Bersani C. y Cuman K. (2009). Immunomodulatory activity of *Zingiber officinale* Roscoe, *Salvia officinalis* L. and *Syzygium aromaticum* L. essential oils: evidence for humor- and cell-mediated responses. *JPP*, 61: 961–967
- Catalogue of life. (2020). *Word plants*. Leiden, the Netherlands Recuperado de:<http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/41d6f9fb865ff8f2933678c089dc7eac/synonym/d274dfbd12c4889bcb65455ab028e8c6>
- Chavdarova, K. (2019). *El cultivo in vitro como fuente de producción de metabolitos secundarios*. Facultad de farmacia Universidad Complutense, Madrid, España.
- Chen, D., Xu, F., Zhang, P., Deng, J., Sun, j., Wen., X., Liu, J. (2017). Practical Synthesis of  $\alpha$ -Amyrin,  $\beta$ -Amyrin, and Lupeol: The Potential Natural Inhibitors of Human Oxidosqualene Cyclase. *Arch. Pharm. Chem*, 350(12), 1-9.
- Chóez I., García J., Sánchez C., Pesantes C., Flores J. y Manzano P. (2019). Identification of lupeol produced by *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. leaf callus culture. *Natural Product Research*, 1478-6427.

- Choi H., Yeon J. y Eui Y., (2020). Identification of triterpenes and functional characterization of oxidosqualene cyclases involved in triterpene biosynthesis in lettuce (*Lactuca sativa*). *Plant Science*, 301.
- Contini S., Salvador M., Balanco F., Albuquerque S. y Oliveira D., (2004). Antiprotozoal Effect of Crude Extracts and Flavonoids Isolated from *Chromolaena hirsuta* (Asteraceae). *Phytother.* 18, 250–254.
- *Conyza filagionoides*. *Phytochemistry*, 11, 1855 -1856.
- Cortes, A., Pérez, C y Sánchez M. (2017). *Importancia de los cultivos vegetales in vitro para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación*. Bogotá, Colombia: Facultad de Ciencias de la Salud UCMC.
- Cram MM & Fraedrich, SW. (2009) Seeds diseases and seed borne pathogens of North America. *Tree Plant Notes* 53:35–44.
- Cruz Francisco (2012). *Cultivo de tejidos vegetales (Manual de prácticas)*. Departamento de Ciencias Agrícolas. Universidad Nacional Autónoma de México. Ediciones UNAM Fesc. México.
- Cruz, I. y González, A. (2009). Biotecnología aplicada a la producción de metabolitos secundarios. *Lacandonia*, 3 (2), 59-65.
- Cueva, J & Lucero, H. (2018). Evaluación de los reguladores de crecimiento (Kinetina y Ácido giberélico) para acelerar la germinación de *Gynoxys verrucosa*. *Revista bionatura*, 3(4): 734-739.
- De Amorim, M., Godinho, W; Archanjo, F., Grael, C. (2016). Chemical constituents of *Pseudobrickellia brasiliensis* leaves(Spreng.) R.M. King & H. Rob. (Asteraceae). *Rev. Bras. Pl. Med., Campinas*, 18(2): 408-414.
- Del Solar C. 1985. *Usando técnicas del cultivo de tejido. micropropagación de plantas*. ICTA-JOCV. Guatemala - México.
- Devi CS, Murugesh S, Srinivasan VM (2006). Gymnemic acid production in suspension calli culture of *Gymnema sylvestre*. *J Appl Sci* 6:2263–2268
- Dhar U. y Joshi M., (2005). Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. *Plant Cell Rep*, 24, 195–200.

- Dhas B., Simon N., Selvan A. Rajaram S. y Alexander R., (2016). Comparative effects of plant growth regulators on callus induction in leaf explants of *Wedelia chinensi*. *South Indian Journal of Biological Sciences*, 2(2), 333-338.
- Di Fernando, M., Brunetti, C., Agati, G., Tattini, M. (2014). Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean áreas. *Environmental and Experimental Botany*, 103: 107-116.
- Domínguez, F. (2015). *La biotecnología y las plantas medicinales*. Biotecnología de Productos Naturales del Centro de Investigación Biomédica de Oriente IMSS.
- Dominguez, X., Quintero, G., y Butrille, D. (1972). Triterpenoids and triacontane from *Conyza filaginoides*. *Phytochemistry*, 11: 1855-1856.
- Duarte, E., Acevedo, M; ansberro, P; Luna, C. (2014). Detección de daño del coleóptero *Amblycerus longesuturalis* para la selección y germinación in vitro de semillas de Peteribí (*Cordia trichótoma* [Vell.] Arrab. ex Steudel). *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*, 113 (1): 18-27.
- Egamberdieva, D & Tiezzi, A. (2019). *Medically Important Plant Biomes: Source of Secondary Metabolites, Vol 15*. Lucknow, India: Springer: 133-152
- Ekhlás A.y Kareem M., (2020). Stimulation of the production of some medicinally active compounds from callus tissue induced from the shoot tip of paracress seedlings in vitro through adding different concentrations of glutamine. *Plant Archives*, 20(2), 790-796.
- Elaleem, K., Saeed, B y Mohamed, M. (2015). Effect of plant growth regulators on *Helianthus annuus* L. callus induction. *International Journal of Innovation and Applied Studies*. 13 (2), 348-354.
- Espinosa H., García J. y Rodríguez R. (2016). NanoBio: los compuestos bioactivos y tecnologías de extracción. Zapopan, Jalisco, Méxio, CIATEJ
- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. (2013). 2° edición. México
- Farzami MS, Ghorbant M. (2005). Formation of catechin in callus cultures and micropropagation of *Rheum ribes* L. *Pak J Biol Sci*, 8:1346–1350

- Ferdinando M., Brunetti C., Agati G. y Tattini M. (2014). Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. *Environmental and Experimental Botany*. 103, 107-116.
- Ferrer A., Altabella T., Arró M. y Boronat A. (2017). Emerging roles for conjugated sterols in plants. *Progress in Lipid Research*, 67, 27-37.
- Flores, A., Álvarez, G., Rodríguez, J., Corona, A. (2008). Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. *Foresta Veracruzana* 10(2), 27-33.
- Francoise B, Hossein S, Halimeh H, Zahra NF. (2007). Growth optimization of *Zataria multiflora* Boiss. Tissue cultures and rosmarininc acid production improvement. *Pak J Biol Sci* 10:3395–3399.
- Gallo, M y Sarachine, M. (2009). Biological Activies of Lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 3(1), 46-66.
- Gattuso, S., Scandizzi, Á., busilacchi, H., di sapio, O., Severin, C. (2007). *Achyrocline satureioides* (lam.) dc.: propagación *in vitro* a partir de segmentos nodales. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 11: 45-55.
- George e., (1996). *Plant propagation by tissue culture*; part 2. in Practice. 2 ed. exegetics Limited. England.
- George, E. F. (1993). *Plant propagation by tissue culture*. Chapter 5, Part 1. 2nd. Netherlands: Springer ,130-143
- George, E., Hall, M y Klerk, G. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. Paises Bajos: Springer
- Ghosh, S. (2016). Biosynthesis of Structurally Diverse Triterpenes in Plants: the Role of Oxidosqualene Cyclases. *Proc Indian Natn Sci Acad*, 8 (4), 1189-1210
- Gibson & Carlson. (2003). Methods of treating fungal infections using lupeol. United States patent.
- Gomez Z. y Jiménez J. (2011). Producción *in vitro* de antocianinas – revisión. *Acta Biológica Colombiana*, 16(1), 3-20.

- Gopal K & Merillon, J. (2013). *Natural Products. Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Udaipur, India: Springer
- Orhan, I. (2012). *Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites*. Ankara Turquía: Bentham Science Publishers.
- Gopi C, Vatsala TM. (2006). *In vitro* studies on effects of plant growth regulators on callus and suspension culture biomass yield from *Gymnema sylvestre* R. Br. *Afr J Biotechnol*, 5(12),1215-1219.
- Gupta, P., Sharma, S y Saxena, S. (2010). Callusing in *Stevia rebusiana* (Natural Sweetener) for Steviol Glycoside Production. *Int J Agric Biol Sci*, 4(12), 893-897.
- Halim, M., Forhad, M., Hafizur, M., Hossain, M y Uddin, M. (2016). Sterilization process for *in vitro* regeneration of *Stevia (Stevia rebusiana Bertoni)*. *International journal of business, social and scientific research*, 4(4), 320-323.
- Hammer K., Carson C. y Riey T. (2003). Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 853–860.
- Harikrishnan, K; Martin, K; Anand, P; Hariharan, M. (1997). Micropropagation of sweetflag (*Acorus calamus*) a medicinal plant. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 19: 427-429.
- Harraz, F.M. y Amer, M.E. (1988). Constituents of *Conyza linifolia* (Willd) Tackh. *Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences* 2: 127-129.
- Hernández, F. (1959). *Historia Natural de Nueva España*, vol. 1, p.p .811. Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F.
- Hoefnagels MH & Linderman RG. (1999). Biological suppression of seedborne *Fusarium* spp. during cold stratification of Douglas fir seeds. *Plant Dis* 83:845–852.
- Hohtola A, Jalonen J, Tolnen A et al (2005) *Natural product formation by plants, enhancement, analysis, processing and testing*. In: Jalkanen A, Nygren P (eds) *Sustainable use renewable natural resources from principles to practices*. University of Helsinki Publication, Finland, pp 34–69

- Holanda, S., Pinto, L., Cunha, G., Chaves, M., Santos, F y Rao, V. (2008). Anti-inflammatory effect of  $\alpha$ ,  $\beta$ -Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology*, 16:48–52
- Huang, L., Li, J., Ye, H., Li, C., Wang, H., Liu, B., Zhang, Y. (2012). Molecular characterization of the pentacyclic triterpenoid biosynthetic pathway in *Catharanthus roseus*. *Planta*, 236: 1571–1581.
- Hurtado D. y Merino M. (1994). *Cultivo de tejidos vegetales*. México: Ediciones Trillas.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K. and Iwase, A. (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant cell*, 25(9), 3159–3173.
- James, J y Dubery, I. (2009). Pentacyclic Triterpenoids from the Medicinal Herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. *Molecules*, 14(10), 3922-3941.
- Jayachandran M., Wu Z., Ganezan K., Khalid S. y Chung S. (2019). Isoquercetin upregulates antioxidant genes, suppresses inflammatory cytokines and regulates AMPK pathway in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions* 303, 62–69.
- Jedinak A., Faragó J., Pšenáková I. y Maliar T. (2004). Approaches to flavonoid production in plant tissue cultures. *Biologia, Bratislava*, 59(6), 697-710.
- Kabir, S., Shaikh, W., Shahzadi S., Kazi, T., Usmanghani, K., Kabir, A and Sheerazi, T. (2008). Chemical constituents of *Tamarindus Indica* l. medicinal plant in Sindh. *Pak. J. Bot.*, 40(6): 2553-2559.
- Karakas, F.P. y Turker, A.U. (2013). An efficient *in vitro* regeneration system for *Bellis Perennis* L. and comparison of phenolic contents of field grown and *in vitro* grown leaves by LCMS/MS. *Ind Crop Pro* 48:162-170.
- Karou D., Dicko M., Simpore j. y Traore A. (2005) Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of *Burkina Faso*. *African Journal of Biotechnology*, 4 (8), pp. 823-828.

- Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research* 3:1222-1239.
- Khan T, Krupadanam D, Anwar Y. (2008). The role of phytohormone on the production of berberine in the calli culture of an endangered medicinal plant, turmeric (*Coscinium fenestratum* L.). *Afr J Biotechnol* 7:3244–3246.
- Khurshid R., Khan T., Zaeem A., Garros L., Hano C. y Abbasi B. (2018). Biosynthesis of precious metabolites in callus cultures of *Eclipta alba*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 135, 287–298.
- Kim D. y Lim S. (2017). Optimization of Subcritical Water Hydrolysis of Rutin into Isoquercetin and Quercetin. *Nutr Food Sci.*, 22(2), 131–137.
- Kiong AL, Mahmood M, Fodzillan NM, Daud SK. (2005). Effects of precursor supplementation on the production of triterpenes by *Centella asiatica* callus culture. *Pak J Biol Sci*, 8:1160–1169
- Krishnan J., Gangaprasad A. y Satheeshkumar K. (2019). Biosynthesis of Camptothecin from Callus and Cell Suspension Cultures of *Ophiorrhiza mungos* L. var. *angustifolia* (Thw.) Hook. f. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89(3):893–902.
- Krishnan, K y Mathew, Limi. (2014). Anti-inflammatory potential of  $\beta$ -amyrin, a triterpenoid isolated from *Costus igneus*. *Inflammopharmacol* 22:373–385
- Krishnaswamy N. y Prasanna S. (1975).  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin esters and sitosterol glucoside from *Spilanthes acmella*. *Phytochemistry*, 14, 1666-1667.
- Kulus D. y Timoszuk A. (2020). Induction of Callogénesis, Organogenesis, and Embryogenesis in Non-Meristematic Explants of Bleeding Heart and Evaluation of Chemical Diversity of Key Metabolites from Callus. *Int. J. Mol. Sci.*, 21.
- Kumar, P y Saran, S. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer.India: 27-37
- Kweifio, G., Munk, F., Macrides, T., Smith, P y Rumble, B. (1995). Antiarthritic Mechanisms of Lupeol Triterpenes. *Drug Development Research*, 36:20-24



- Laghari, A., Memon, S., Nelofar, A y Khan, K. (2011). *Alhagi maurorum*: A convenient source of lupeol. *Industrial Crops and Products* 34: 1141–1145.
- Lakshmi, V., Mahdi, A., Kaleem, M., Kumar, S., Kumar, A. (2014). Antidiabetic Activity of Lupeol and Lupeol Esters in Streptozotocin. *Induced Diabetic Rats. Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 17(2): 138-146.
- Lañes, P. (1998). *Metabolismo energético. In: Curso de microbiología general. Facultad de Ciencia Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste. Corriente República, Arg. [Fecha de consulta: 12 de septiembre 2020]. Disponible en: [http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/15\\_micro.htm](http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/15_micro.htm).*
- Leal C., Garza C. y Lara S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248, 1–18.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E y Mroginski, L. (2010). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Consejo Argentino para la información y el desarrollo de la Biotecnología. Argentina: INTA*
- Li A., Li S., Zhang Y., Xu X., Chan Y. y Li B. (2014). Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients*, 6, 6020-6047.
- Lizarraga, Paulin., Miranda, Castro., Moreno Martinez E, Lara, Sagahon, A., Torres., Pacheco, I. (2013) Maize seed coatin
- gs and seedling sprayings with chitosan and hydrogen peroxide: their influence on some phenological and biochemical behaviors. *J Zhejiang Univ Sci B (Biomed Biotechnol)*, 14:87–96.
- Luca S., Macovei I., Bujor A., Miron A. Wozniak K., Apostosoai A. y Trifan A. (2019). Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(4),1-34.
- Luczkiewicz M.T. (2008). “Research into Isoflavonoid Phyto-oestrogens in Plant Cell Cultures”, en Ramawat KG, Merillon JM (eds.), *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, Heidelberg, Alemania: Springer-Verlag Berlin:55-85.
- Maharik N, Elgengaihi S, Taha H. (2009). Anthocyanin production in callus cultures of *Crataegus sinaica* Bioss. *Intrn J Acad Res* 1:30–34
- Mahmood M., Nomi R. y Subramaniam S. (2010). Optimization of suitable auxin application in a recalcitrant woody forest plant of *Eurycoma longifolia*

(Tongkat Ali) for callus induction. *African Journal of Biotechnology*, 9(49), 8417-8428.

- Malik, S. (2017). *Biotechnology and Production of Anti-Cancer Compounds*. Springer. Sao Luis, Brazil. Pags: 1- 38.
- Mandalho L., Ferreira F., Tavares J. y Bastos J. (2007). Anti-inflammatory and analgesic activities of the ethanolic extracts from *Zanthoxylum riedelianum* (Rutaceae) leaves and stem bark. *JPP*, 59: 1151–1158.
- Manjulatha K., Saritha K. y Setty O. (2014). *Phytochemistry, Pharmacology and Therapeutics of Hemidesmus indicus (L.) R. Br.* Department of Biochemistry, University of Hyderabad. Hyderabad, India.
- Marcu, D., Halmágyi, A, Besenyei E., Clapa, D., Cristea, V. (2014). *In vitro* conservation of Flra, *Achillea pyrenaica* sibth. ex godr., a pyrenean endemic specie. *Științele Naturii*, 30(2), 55-60.
- Martínez, A. (2018). *Cultivo de células en suspensión de Borojoa patinoi para la producción de compuestos con actividad citotóxica y genotóxica*. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Martinez, M., Hernández, C., Restrepo, B. (2007). Estandarización de un protocolo para la obtención de callos friables de borojó (*Borojoa patinoi* Cuatr.) fase I. *Rev.Colomb.Biotecnol*, 9 (2): 45-55.
- Melo, C., Morais, T., Tome, A., Brito, G., Chaves, M., Rao, V y Santos, F. (2011). Anti-inflammatory effect of  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Inflamm. Res*, 60:673–681.
- Mercado, S y Seir, A. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae). *Acta agronómica*, 61 (1), 69-78.
- Metwally, M.A. (1989). Egyptian compositae 18 New triterpene from *C. aegyptiaca*. *Chem Sci*. 44: 1584.
- Mirjalili, MH., Moyano, E., Bonfill, M. (2009). Steroidal lactones from *Withania somnifera*, an antioxidant plant for novel medicine. *Molecules* 14:2373–2393

- Misra N., Misra P., Datta K. y Mehrotra S., (2005). *In vitro* biosynthesis of antioxidants from *Hemidesmus indicus* r. br. cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 41,285–290.
- Mohammad, A y Naseem, A. (2016). *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement*. Aligarh, India: Springer, Págs.: 161-195.
- Monhanlall V. (2020). Plant Cell Culture Systems for the Production of Secondary Metabolites - A Review. *IOSR-JBB*, 6, 35-47.
- Nguemfo, E., Dimo, T., Dongmo, A., Azebaze, A., Alaoui, K., Asongalem, A., Cherrah, Y and Kamtchouing, P. (2009). Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of some isolated constituents from the stem bark of *Allanblackia monticola* Staner L.C (Guttiferae). *Inflammopharmacology* 17, 37–41.
- Niazian M. (2019). Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants. *Planta*, 249, 953–973.
- Nikiema, J., Fastre, R., Vanhaelen, M., Fontaine, J., De Graef, C and Heenen, M. (2001). Effects of Antiinflammatory Triterpenes Isolated from *Leptadenia hastata* Latex on Keratinocyte Proliferation. *Phytotherapy Research Phytother.* 15, 131–134.
- Nikolaeva TN, Zagoskina NV, Zaprometov MN (2009). Production of phenolic compounds in callus cultures of tea plant under the effect of 2,4-D and NAA. *Russ J Plant Physiol* 56:45-49.
- Nizynski, B., Mahmood, A., Marek, C., Szakiel, A. (2015). The content of free and esterified triterpenoids of the native marigold (*Calendula officinalis*) plant and its modifications in *in vitro* cultures. *Phytochemistry Letters*, 11, 410-417.
- Olivira AJB, Koika L, Reis FAM, Shepherd SL. (2001). Callus culture of *Aspidosperma ramiflorum* Muell. -Arg. Growth and alkaloid production. *Acta Sci* 23:609–612.
- Orihara, Y y Ebizuka, Y. (2010). *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. London, UK. Academic Press: 341-347.

- Orozco, F., Sepulveda, G., Trejo, T., Zamilpa, A and Rodríguez., M. (2011). Oxygen limitations to grow *Azadirachta indica* cell culture in shake flasks. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(3), 343–352.
- Orozco-Sánchez, F. (2002). *Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de Eucalyptus cinerea y evaluación de la producción de 1,8 cineol y otros terpenoides*. Universidad Nacional de Colombia.
- Ovalle, B, Rivero, I y Mata, R. (2014). Quality control tests for the crude drug of *Conyza filaginoides*, *Pharmaceutical Biology*, 52(1): 117–123
- Ovalle, B., Déciga, M and Mata, R. (2015). Antinociceptive and hypoglycaemic evaluation of *Conyza filaginoides* (D.C.) Hieron Asteraceae. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 67(12), 1733–1743.
- Pace, G., Bruno, A y Spano, L. (2009). *In vitro* plant regeneration and clonal micropropagation of *Leontopodium nivale*(Ten.). Heut ex Hand.Mazz(Asteraceae). *Plant Biosys* 143(1),512-516.
- Paduch R., Kandefer M., Trytek M. y Fiedurek J. (2007). Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 55, 315-327.
- Park J., Seong Z., Jim M., Ha J., Moon K., Lee H., Lee H., Jeon J., Park S. y Kim H. (2020). Production of Flavonoids in Callus Cultures of *Sophora flavescens* Aiton. *Plants*, 9(6), 2-13.
- Pereira I. Garcia M., Silva M., Chves A., Rodrigues R., Meirelles M. y Masahiko M. (2019). Phytochemical and biological studies on *Piptocarpha axillaris* (Less.) Baker (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 85, 24-30.
- Pérez J. y Claire C. 2004. Evaluación de medios de cultivo con diferentes agentes gelificantes en micropropagación de espina de mar (*Hippophae rhamnoides* L.). Memorias IV Reunión Nacional de Biotecnología, Santa Cruz, Bolivia.
- Pérez, N., y Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal* ,11(4), 195 – 211

- Pernezny, K., Nagata, R., Raid, R. N., Collins, J., and Carroll, A. (2002). Investigation of seed treatments for management of bacterial leaf spot of lettuce. *Plant Dis.* 86:151-155.
- Phillips, D., Rasbery, J., Bartel, B y Matsuda, S. (2006) Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization, *Curr. Opin. Plant Biol.* 9 (3), 305 –314.
- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Editorial Mundi Prensa, Madrid, España. Págs:326
- Pietta P., Minoggio M. y Bramati L. (2003). Plant polyphenols: structure, occurrence and bioactivity. *Studies in Natural Products Chemistry*, 28(1), 257-312.
- Plantas medicinales (2013). *Conyza filaginoides*-Simonilla. Recuperado el 8 de noviembre del 2020, de: [www.plantas-medicinales.org/conyza-filaginoideas-simonilla/](http://www.plantas-medicinales.org/conyza-filaginoideas-simonilla/)
- Pola, E., Cruz, A., Santiz, Susa
- n., Suchiapa, R., Gomez, A. (2019). Efecto del ácido indol-3-acético y del tipo de explante en la callogénesis de girasol (*Helianthus annus* L.). *Ibciencias 2* (2), 7-11.
- Pollard & Walker. (1990). *Plant Cell and Tissue Culture*, Vol 6. Nueva Jersey Estados Unidos: Humana Press: 1-12.
- Prieto, H., Jordan, M., Barruto.P., Cordeiro, Maria., Durzan, D. (2005). *Bioteconología Vegetal*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA. Santiago, Chile: Colección libros INIA.
- Qin G., Ma J., Huang Q., Han J., Li M., Deng Y., Hassan W. y Shang J., (2018). Isoquercetin Improves Hepatic Lipid Accumulation by Activating AMPK Pathway and Suppressing TGF- $\beta$  Signaling on an HFD-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease Rat Model. *Int. J. Mol. Sci.*, 19.
- Quesada S, Azofeifa G, Jatunov S, Jiménez G, Navarro L, Gómez G. (2011). Carotenoids composition, antioxidant activity and glycemic index of two varieties of *Bactris gasipaes*. *Emir J Food Agric*, 23: 482-489.

- R. Mata, A. Rojas, L. Acevedo, S. Estrada, F. Calzada, I. Rojas, R. Bye, and E. Linares. (1997). Smooth Muscle Relaxing Flavonoids and Terpenoids from *Conyza filaginoides*. *Planta Medica*, 63(1): 31-35
- Ramos, J., Calderón M., Navarro, Barros, J., Ragazzo, J. (2018). Use of emerging technologies in the extraction of lupeol,  $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -amyrin from sea grape (*Coccoloba uvifera* L.). *J Food Sci Technol*, 55(7),2377–2383
- Rao, A & Rao, L. (2015). *Phytochemicals. Isolation, Characterisation and Role in Human Health*. Rijeka, Croatia: IntechOpen, p 84.
- Razafindrakoto H., Aimée C., Emile V., Bodo B., Rafanomezantsoa R. y Rakotovao M., (2020). Flavonoid and triterpenes from the leaves of *Senecio gossypinus* Baker from Madagascar. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(2), 1279-1282.
- Roberta H. Smith. (2012). *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments: 3ed.* Academic Press, Amsterdam: 31-40.
- Roca, W y Mroginski, L. (1993). *Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Cali Colombia: CIAT
- Roca, W.M., Mroginski,L.A. (1991). “*Cultivo de tejidos en la agricultura“ Fundamentos y aplicaciones*”. Ed CIAT, p 953.
- Rocha P. (2006). *Segundo Congreso Internacional De Plantas Medicinales y Aromáticas*. Laboratorio de Caracterización Molecular, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Bogotá, Colombia.
- Rout, J. R y Sahoo, S.L. (2013). *In vitro* propagation of *Elephantopus scaber* L. *Asian Pac J Mol Biol Biotechnol*, 21:59-66.
- Ruiz Méndez, M.V.; Huesa Lope, J.; Pereda, J. y Dobarganes, M.C. (1991). "Ensayos para la refinación de la manteca de Karité". *Grasas y Aceites* 42, 121-126.
- Saeidnia S. (2015). *New Approaches to Natural Anticancer Drugs*, Tehran, Iran, Springer.
- Salazar, A. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae). *Acta Agronómica*. 61(1), 69-78.

- Sánchez, M., Marquina, S., Romero, A., Bernabé, A., Cruz, F., González, J., Acevedo, J., Perea, I y Alvarez, L. (2018). Establishment and Phytochemical Analysis of a Callus Culture from *Ageratina pichinchensis* (Asteraceae) and Its Anti-Inflammatory Activity. *Molecules*, 23(6), 1258.
- Sánchez, M. (2019). “Establecimiento de cultivos de callos y células en suspensión a partir de *Ageratina pichinchensis* (Asteraceae) para la producción de metabolitos secundarios bioactivos”. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México.
- Santos, F., Torres, J., Rodrigues, B., Sousa, T., Carvalho, A., Castro, G., Helena, M y Satyanarayana, V. (2012). Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids in Health and Disease*, 11(98), 1-8.
- Santos-Gomes, PC., Seabra, RM., Andrade, PB., Fernandes-Ferreira, MM. (2002). Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Sci* 162:981–987.
- Saran, S y Kumar, P. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Agra, India: Springer.
- Shao, Y., Zhou, B., Ma, K., Wu, H. (1995). Medicagenic acid saponins from *Aster batangensis*. *Phytochemistry*, 39(4), 875–881.
- Sharma A., Shahzad B., Rehman A., Bhardwaj R., Landi M. y Zheng B. (2019). Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules*, 24(13), 2452.
- Sharma, N., Palia, P., Chaudhary, A., Verma, K y Kumar, I. (2020). A Review on Pharmacological Activities of Lupeol and its Triterpene Derivatives. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 10(5):325-332.
- Sharp, M and Doran, P. (2001). Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. *Biotechnol. Progr.* 17(6), 979-992.
- Sharry S., Adema, M y Abedini, Walter. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. *Plantas de probeta*. (2015). Universidad

de la plata. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Editorial de la Universidad de la plata. Buenos Aires, Argentina.

- Shibuya, M., Katsube, Y., Otsuka, M., Zhang, H., Tansakul, P., Xiang, T., Ebizuka, Y. (2009). Identification of a product specific  $\beta$ -amyrin synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(1), 26–30
- Shirwaikar, A., Setty, M and Bommu, P. (2004). Effect of lupeol isolated from *Crataeva nurvala* Buch. -Ham. Stem bark extract against free radical induced nephrotoxicity in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 42: 686-690.
- Shrivastava N, Patel T, Srivastava A. (2006). Biosynthetic potential of *in vitro* grown callus cells of *Cassia senna* L. var. *senna*. *Curr Sci*, 90:1472-1473.
- Siddique H. y Saleem M. (2011). Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies. *Life Sciences*, 88, 285-293.
- Siddiqui M., Bansal V. y Prasad K. (2017). *Plant secondary metabolites: stimulation, Extraction, and Utilization, Volumen 2*. Oakville, Canada, Apple Academic Press Inc.
- Silvestrine, A, Pasqua G, Botta B, Monacelli B, van der Heijden R, Verpoorte R. (2002). Effects of alkaloid precursor feeding on a *Camptotheca acuminata* cell line. *Plant Physiol Biochem*, 40:749-753.
- Singh DN., Verma N., Raghunwanshi S. (2006). Antifungal anthraquinone from *Saprosma fragrans*. *Bioorg Med Chem Lett*, 16:4512–4514.
- Skoog, D., Holler, J., Crouch, S. (2008). *Principios de análisis instrumental*. 6° edición. Cengage Learning. Mexico D.F. Págs.: 762-763.
- Soldi, C., Pizzolattia, M., Luiz, A., Marcon, R., Meotti, F., Miotob, L., Santos, A. (2008). Synthetic derivatives of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(6): 3377-3386.
- Sottomayor M, López Cardoso I, Pereira LG, Barceló A (2004). Peroxidase and the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Phytochem. Rev.* 3: 159-171.



- Stepan-Sarkissian G. (1990). *Selection of Media for Tissue and Cell Culture*. In: Pollard J.W., Walker J.M. (eds) *Plant Cell and Tissue Culture. Methods in Molecular Biology™*, vol 6. Humana Press.
- Suárez, I y Salgado, J. (2008). Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* BERT. (Asteraceae-Eupatorieae) a través de organogénesis. *Temas agrarios*. 13(1), Págs.: 40-48.
- Sunitha, S., Nagaraj, M y Varalakshmi, P. (2001). Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats. *Fitoterapia*, 72(6), 516-523
- Tada, T., Tezuka, Y., Shimomura, K., Ito, S. Hattori, H and Kadota, S. (2001). Effect of depigmentation of 3,4-di-O-caffeoylquinic acid guided by tyrosinase inhibitory activity from *Conyza filaginoides*. *J. Oleo Sci.*50(4).211-215.
- The United States Pharmacopeial Convention. (2015). *Dietary Supplements Compendium, Volume 1 and 2*. The United States Pharmacopeial Convention.
- Tisserat, B. (1985.) *Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration*. En: Ixon, R. (Ed). *Plant Cell Culture, A Practical Approach*. IRL Press, Oxford :79-105
- Trejo, G and Rodríguez, M. (2007). La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. *Interciencia*, 32(10), 669-674.
- Tripathi M., Misha S., Shyam C., Singh S. y Ahuja A. (2019). Plant Tissue Culture Technology: Sustainable Option for Mining High Value Pharmaceutical Compounds. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.*, 8(2): 1002-1010.
- Upadhyay R., Pandey M., Jha R. y Pandey V., (2000). Eclalbatin, a Triterpene Saponin from *Eclipta Alba*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 3(3), 213-217.
- Van Staden, J; Fennell, C; Taylor, N. (2006). Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae*, 725: 55-62.
- Vargas, V y Flota, F. (2006). *Plant Cell Culture.Protocols*.2º edición. Humana Press. New Jersey.USA: 369-376.

- Varindra S., Saikia R., Sandhu S., Gosal SS. (2000). Effect of nutrient limitation on capsaicin production in callus culture derived from pericarp and seedling explants of *Capsicum annum L. varieties*. *Plant Tissue Cult* 10:9-16.
- Vázquez, O. (2014). *Aislamiento de metabolitos secundarios de la corteza de Spondias purpurea L. Fest Zaragoza*, UNAM.D. F, México.
- Villareal, M., Cardoso, A., Ortiz, A and Sharma, A. (2014). Biotecnología para producir medicinas de plantas mexicanas. *Revista digital Universitaria*, 15(8), 1-15.
- Villegas L. 1988. *Cultivo de tejidos vegetales aplicados a la producción agrícola*. Venezuela: signo Caracas.
- Walton, N y Brown D. (1999). *Chemicals from Plants: Perspectives On Plant Secondary Products*. World Scientific. London: Imperial College. Págs:216
- Wang J., Li J., Li J., Li J., Liu S., Huang L. y Gao W. (2017). Production of Active Compounds in Medicinal Plants: From Plant Tissue Culture to Biosynthesis. *Chinese Herbal Medicines*, 9(2), 115-125.
- Wang J., Xu J., Yang M., Zhang C. y Li M. (2019). Biosynthesis, Chemistry, and Pharmacology of Polyphenols from Chinese Salvia Species: A Review. *Molecules*, 24(1), 155.
- Williams A.y Barry B. (1991). The enhancement index concept applied to terpene penetration enhancers for human skin and model lipophilic (oestradiol) and hydrophilic (5-fluorouracil) drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 74, 157- 168.
- Winson K., Chew B., Sathasivam K. y Subramaniam S. (2020). The establishment of callus and cell suspension cultures of *Hylocereus costaricensis* for the production of betalain pigments with antioxidant potential. *Industrial Crops & Products*, 155.
- Wood C., Lee K., Vaisberg A., Kingston D., Neto C. y Hammond G. (2001). A Bioactive Spirolactone Iridoid and Triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. *Chem. Pharm. Bull*, 49(11):1477-1478.

- Wuang J., Li J., Li J., Liu S., Huang L. y Gao W. (2017) Production of Active Compounds in Medicinal Plants: From Plant Tissue Culture to Biosynthesis. *Chinese Herbal Medicines*, 9(2): 115-125.
- Yanagawa, T., Nagai, M., Ogino, T. and Maeguchi, R. (1995). Application of disinfectants to orchids seeds, plantlets and media as a means to prevent *in vitro* contamination. *Lindleyana* 10:33–36.
- Yazaki k., 2004, “*Natural Products and Metabolites*”, en Klee, H. and Christou, P., Eds *Handbook of Plant Biotechnology*, pp. 811–857, John Wiley & Sons Ltd, s.l.
- Yildiz, M y Er, C. (2002). The effect of sodium hypochlorite solutions on *in vitro* seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). *Naturwissenschaften*, 89:259–261.
- You Y., Nam N., Kim Y., Bae K. y Ahn B., (2003). Antiangiogenic Activity of Lupeol from *Bombax ceiba*. *Phytother. Res.* 17, 341–344.
- Yu, Y., Chang, P., Yu, H., Ren, H., Hong, D., Li, Z., Wang, Y., Song, H., Huo, Y y Li, C. (2018). Productive Amyrin Synthases for Efficient  $\alpha$ -Amyrin Synthesis in Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, 7 (10), 2391-2402.
- Zhao, J., Davis, L and Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Advances*. 23(4), 283-333.
- Zuñiga, C., Valdez, S., Peralta, H., Wilson, M., Burgueño, R., Auras, R. y Meza, G. (2016). Development of an antioxidant biomaterial by promoting the deglycosylation of rutin to isoquercetin and quercetin. *Food Chemistry*, 204, 420–426.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00279

Matrícula: 2183801696

Establecimiento de cultivos celulares de *Coryza filaginoides* para la producción de metabolitos secundarios bioactivos.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 18 del mes de noviembre del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO  
DR. ANTONIO BERNABE ANTONIO  
DRA. MARIANA SANCHEZ RAMOS  
DR. GABRIEL ALFONSO GUTIERREZ REBOLLEDO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

DE: MIRIAM CORAL SOTO HERNANDEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

VOCAL

DR. ANTONIO BERNABE ANTONIO

VOCAL

DRA. MARIANA SANCHEZ RAMOS

SECRETARIO

DR. GABRIEL ALFONSO GUTIERREZ REBOLLEDO

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella